Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. W. Bonte

Untersuchung zur Anti-GM-Eigenschaft von Rinderseren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Petra Birkner

1986

UNIV.
LEIDEN
KOL.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. W. Bonte

Untersuchung zur Anti-GM-Eigenschaft von Rinderseren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Petra Birkner

1986

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.:

Prodekan	Prof. Dr. Berger
Referent	Priv.-Doz. Dr. Henke
Korreferent	Prof. Dr. Brüster

Herrn Dr. J. Henke danke ich für die Überlassung des Themas und seine Anregungen zur Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. E. Osterhaus bin ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten zu Dank verpflichtet.

Frau Dr. G. de Lange hat dankenswerter Weise Referenzuntersuchungen der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 übernommen.

Frau Prof. I. Oepen möchte ich besonderen Dank sagen für ihre Durchsicht des Manuskriptes.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0069

Untersuchungen zur Anti-Gm-Eigenschaft
von Rinderseren

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Problematik der Gewinnung von Anti-Gm-Seren	1
1.2	Spontan-Antikörper in Tierseren	3
1.3	Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit	5
1.4	Nomenklatur	5
2.	Material und Methoden	6
2.1	Gewinnung der Rinderseren	6
2.2	Vorbereitung der Rinderseren für den Agglutinationstest	6
2.3	Screening auf Antihumanglobulin-Eigenschaften mit Anti-Gm- oder Anti-Km-Spezifität in Rinderseren	8
2.3.1	Rheumafaktor(RF)-Latex-Test	8
2.3.2	Agglutinationstest	9
2.3.3	Agglutinationshemmtest	10
2.4	Untersuchungen zur Anti-Gm-Spezifität von zwei Rinderseren (Rs 55 und Rs 92)	12
2.4.1	Differenzierte Anwendungen der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 als Anti-Gm-Seren	12
2.4.2	Gm-Bestimmungen bei Humanseren nach Absorption mit Rinderserum Rs 55 bzw. Rs 92	18
2.4.3	Darstellung verschiedener Reaktionseigenschaften der Rinderseren Rs 55 und Rs 92	19

		Seite
3.	Ergebnisse	23
3.1	Antihumanglobulin-Aktivitäten in Rinderseren	23
3.2	Reaktionsverhalten der Rinderseren Rs 55 und Rs 92	27
4.	Diskussion	40
4.1	Bemerkungen zur Versuchsanordnung	40
4.2	Spezifität des Rinderserums Rs 55	41
4.3	Eigenschaften des Rinderserums Rs 92	44
4.4	Genese der Antihumanglobulin-Eigenschaften in Rinderseren	49
4.5	Serogenetische Anwendungen von Rinderseren als Anti-Gm-Testseren	52
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	54

1. Einleitung

1.1 Problematik der Gewinnung von Anti-Gm-Seren

Genetische Marker auf menschlichen Immunglobulinen haben bald nach der Entdeckung des ersten Gm-Faktors - Gm(a) - durch Grubb und Laurell 1956 (10,13) bei der Untersuchung von Paternitätsfragen sowie in der forensischen Spurenkunde Bedeutung erlangt.
Voraussetzung für die Identifizierung dieses und weiterer Gm-Faktoren ist stets das Vorhandensein von Anti-Gm-Seren entsprechender Spezifität.
Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Ragg-Seren) besitzen in 15 bis 40 % der untersuchten Proben Anti-Gm-Eigenschaften, Seren von Gesunden (SNagg-Seren) in 0,2 bis 0,9 % der Fälle (12,35). Ragg-Seren können zu Fehlbestimmungen führen: Sie weisen häufig ausgeprägte Prozonenphänomene auf und lassen sich durch unverdünnte oder gering verdünnte Humanseren unspezifisch hemmen; außerdem bleiben die Titer der Gm-Antikörper bei Patienten nicht konstant. SNagg-Seren haben günstigere Eigenschaften: Sie zeigen fast nie eine Prozone und werden durch Humanseren, die den entsprechenden Faktor nicht besitzen, nicht gehemmt; gleichbleibende Titer bei einem Spender über Jahre sind die Regel (35).
Prokop äußerte 1976 (34), daß der Aufwand bei der Suche nach Gm-Antiseren beträchtlich sei.
Frequenzen, mit denen Gm-Antikörper (SNagg-Seren) in menschlichen Seren gefunden wurden, zeigen folgende Beispiele aus Angaben der Literatur (s. Tab. 1). Die am häufigsten festgestellte Spezifität war Anti-Gm(a).

Untersucher	Getestete Serumproben	Gefundene Anti-Gm/ (Km)-Spezifität
Ropartz et al 1960 (37)	12000	10 Anti-Gm(a) 2 Anti-Gm(x)
Fünfhausen 1961 (8)	8000	3 Anti-Gm(a)
Ritter, Schmittmann 1964 (36)	45277	11 Anti-Gm(a) 2 Anti-Gm(x) 1 Anti-Gm(b) 1 Anti-InV(a)
Audran 1965 (1)	13000	18 Anti-Gm(a) 2 Anti-Gm(x) 9 Anti-Gm(b)
Göhler 1966 (9)	18499	43 Anti-Gm(a) 4 Anti-Gm(f) 1 Anti-Gm(b)

Tab. 1 Zur Häufigkeit von Anti-Gm-Spezifitäten in menschlichen Seren (Serumproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden nicht einbezogen)

Heterospezifische Seren von immunisierten Tieren können ebenfalls als agglutinierende Anti-Gm-Seren eingesetzt werden oder zur Darstellung der Gm-Faktoren Gm(5), Gm(21) sowie Gm(23) im Präzipitationstest mittels Immundiffusion in Agargel angewandt werden. Mehrere Gm-Merkmale können nur mit Ragg- oder heterospezifischen Anti-Gm-Seren untersucht werden.

Einige Gm-Typen, z.B. Gm(r) (5, Brandtzaeg et al 1961) oder Gm(Ro_2) (38,39, Ropartz et al 1966/67), wurden beschrieben, konnten jedoch aus Mangel an entsprechenden Anti-Gm-Seren nicht weiter untersucht werden. Die Anwendbarkeit des Gm-Systems in einem größeren Untersuchungsumfang wird zur Zeit vor allem durch die nicht ausreichende Verfügbarkeit geeigneter Anti-Gm-Seren limitiert.

1.2 Spontan-Antikörper in Tierseren

In tierischen Seren werden nicht selten Antikörper gegen menschliche Antigene gefunden, ohne daß eine entsprechende Stimulierung nachweisbar ist (2,17). Es handelt sich dabei häufig um Antikörper gegen Glykolipide, die sich zum Beispiel in Form von zellulären ABH-(und Lewis-)Substanzen auf der Erythrozytenoberfläche befinden.

Die Antigengemeinschaft von Blutgruppensubstanzen und Bakterien, die als Ursache der Produktion von Isoagglutininen beim Menschen diskutiert wird, hat zur Bezeichnung der Blutgruppenantigene als heterophile Antigene geführt (21). Die menschlichen Isoagglutinine könnten als "natürliche" Antikörper, die offenbar spontan entstehen, betrachtet werden; ist jedoch ein antigener Stimulus durch Bakterienantigene entscheidend, müssen Isoagglutinine gleichfalls als Immunantikörper aufgefaßt werden. Ihre Spezifität ist gegen mehrere kreuzreagierende Antigene gerichtet: Bakterienmembransubstanzen, Viren, Molluskenextrakte, pflanzliche Polysaccharide, Blutgruppenantigene etc.. Die Entstehung von "natürlichen" Antikörpern in tierischen Seren könnte ebenso erklärt werden (4). Antikörper gegen die Blutgruppensubstanzen A, B, H, P_1, M, N

UNIV. LEIDEN

werden in Human- und Tierseren, zum Teil auch in Rinderseren gefunden. Ohne nachweisbaren Kontakt mit der entsprechenden Substanz werden in menschlichen und tierischen Seren "präformierte" Antikörper gegen Bakterien, Viren, Penicillin, Agar, Glykogen, Dextran etc. angetroffen; eine Abhängigkeit von Umweltfaktoren, Ernährung, Infektionen, Chemikalien ist zu beobachten (41, Überblick bei Scheder 1976), so daß eine Antigengemeinschaft angenommen werden kann.

Sagan (40) berichtete 1981 über das Vorkommen natürlicher Antikörper gegen menschliche Gammaglobuline in Rinderseren. 1982 beschrieb Kirst die Darstellung eines neuen menschlichen Gm-Reaktionstypus mit einem Rinderserum, das von einem nicht speziell immunisierten Schlachttier stammte (18). Die Agglutinationsfähigkeit dieses Rinderserums mit sensibilisierten Erythrozyten (s. Kap. 2.3.2) wurde durch Zusatz von Humanseren mit den Phänotypen Gm(a+x-f+) oder Gm(a+x-f-) stets gehemmt, 9 von 11 getesteten Seren des Typs Gm(a+x+f-) inhibierten ebenfalls (s. Tab. 2).

Ansatz mit menschlichen Seren der Typen	Anzahl der Seren	Hemmung beobachtete = keine Agglutination	keine Hemmung = Agglutination (alle ++++)
Gm(a+x-f+)	92	92	0
Gm(a+x+f+)	38	0	38
Gm(a+x+f-)	11	9	2
Gm(a+x-f-)	13	13	0
Gm(a-x-f+)	187	0	187
insgesamt	341	114	227

Tab. 2 Kirst 1982 (18), Reaktionsergebnisse des Agglutinationshemmtestes eines Rinderserums mit sensibilisierten Erythrozyten.

1.3 Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit

In den durchgeführten Untersuchungen sollte die Anwendbarkeit von Rinderseren als Anti-Gm-Seren geprüft werden. Aus einer größeren Anzahl verschiedener Rinderseren sollten diejenigen mit Antihumanglobulin-Eigenschaften ausgewählt und auf Anti-Gm-Spezifität getestet werden; etwaige Anti-Km-Eigenschaften wären gleichzeitig zu erfassen. Durch Einsatz derartiger Rinderseren als Anti-Gm-Testseren sollten ihre Eigenschaften beurteilt - und das Vorliegen bekannter (oder möglicherweise neuer) Anti-Gm-Spezifitäten festgestellt werden.
Aus dem Verlauf der Arbeit ergaben sich weitere Untersuchungen zur Überprüfung der gefundenen Anti-Gm-Eigenschaften.

1.4 Nomenklatur

Die Bezeichnung der Gm-(und Km-)Faktoren erfolgte in der vorliegenden Arbeit, soweit möglich, nach der numerischen Nomenklatur, entsprechend den 1976 publizierten WHO-Empfehlungen (48).
Bei Angaben aus der Literatur wird überwiegend die in der Quelle benutzte Nomenklatur übernommen.
In den Phänotypen der Humanseren werden nur die Faktoren aufgeführt, die für den jeweiligen Zusammenhang von Bedeutung sind; auf die Bezeichnung der IgG-Subklasse wird bei den wiederholt erwähnten Gm-Allotypen verzichtet.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Rinderseren

Die Rinderblutproben wurden bei Schlachtungen auf dem Schlachthof Duisburg-Meiderich entnommen. Die Rinder wurden nach dem Bolzenschuß in Kopftieflage gebracht und nach Eröffnung der herznahen Blutgefäße von dem austretenden Blut ca. 50 ml in verschraubbaren Kunststoffbehältern aufgefangen.
Proben wurden von 203 Rindern genommen.
Bis zur Trennung des Serums von den zellulären Bestandteilen am gleichen oder folgenden Tag wurde das Material bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Durch hochtouriges Zentrifugieren (5 - 10 min bei 6000 x g) konnten aus jeder Probe 15 - 30 ml Serum gewonnen werden, welches in numerierte Röhrchen (Rs 1, Rs 2 usw. bis Rs 203) gefüllt und bei -28°C eingefroren wurde. 2 - 3 ml jeder Probe wurden für erste Screening-Tests bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2 Vorbereitung der Rinderseren für den Agglutinationstest

Die Überprüfung der nativen Rinderseren Rs 1 bis Rs 50 bestätigte, daß Rinderseren menschliche Erythrozyten der Blutgruppen A_1, A_2, B und O stark agglutinieren bzw. hämolysieren. Zur Entfernung der störenden Blutgruppenagglutinine wurden die inaktivierten Rinderseren mit menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe O absorbiert.

Inaktivierung der Rinderseren:
Die Rinderseren wurden 1,5 Stunden bei 58°C im Brutschrank inkubiert. Hierdurch wurden die Komplementfak-

toren im Rinderserum zerstört und bei der nachfolgenden Absorption mit Erythrozyten kam es nicht zur Hämolyse. Die bei menschlichen Seren übliche Inaktivierungszeit und -temperatur erwiesen sich als nicht ausreichend. Das Rinderkomplement zeigte eine geringere Thermolabilität, so daß bei Versuchen mit kürzerer Inkubation oder niedrigerer Temperatur bei vielen Rinderseren noch Hämolyseaktivität vorhanden war.

Absorption der Rinderseren:

Die zur Absorption vorgesehenen 0 D-positiven Blutkörperchen wurden 10 mal mit dem 10fachen Volumen 0,9 %iger NaCl-Lösung* gewaschen, um eine Verunreinigung mit menschlichen Serumproteinen auszuschalten. Gewaschenes Erythrozytensediment und inaktivierte Rinderseren wurden im Verhältnis 1:2 vermischt und über Nacht bei +4°C im Kühlschrank inkubiert. Absorptionszeiten von 1 - 2 Stunden waren ausreichend, wenn durch Umschütteln der Röhrchen in Abständen von 10 - 15 min ein intensiverer Kontakt zwischen Serum und Erythrozyten erreicht wurde. Nach Zentrifugieren (5 min bei 4500 x g) wurde das überstehende, absorbierte Rinderserum abpipettiert.

Überprüfung der Absorption:

Auf Hohlschliffobjektträgern wird 1 Tropfen jedes absorbierten Rinderserums mit einem Tropfen 3 %iger Erythrozytensuspension gemischt und nach einer Stunde Inkubation bei +10°C in feuchter Kammer auf Agglutination geprüft. Bei vollständiger Absorption trat makroskopisch keine sichtbare Reaktion auf.

---

* Das Waschen der Erythrozyten und die Verdünnung der Rinder-, Human- und Antiseren erfolgte bei allen Versuchen - sofern nicht besonders vermerkt - stets mit 0,9 %iger NaCl-Lösung.

2.3 Screening auf Antihumanglobulin-Eigenschaften mit Anti-Gm- oder Anti-Km-Spezifität in Rinderseren

2.3.1 Rheumafaktor(RF)-Latex-Test

Prinzip: Die häufig in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis enthaltenen Rheumafaktoren stellen Antikörper gegen Immunglobuline dar (45). Sie reagieren insbesondere mit Determinanten des Fc-Teiles von IgG-Molekülen und können Anti-Gm-Spezifitäten aufweisen. Zum Nachweis von Rheumafaktoren werden in der klinischen Serologie u.a. an Latexteilchen adsorbierte Immunglobuline benutzt.
Die 203 Rinderseren wurden im Rheumafaktor-Latex-Test auf ihre Reaktionsfähigkeit mit den präparierten Latexpartikeln überprüft.

Durchführung des Testes mit Rinderseren: Anstelle von Patientenserum wurden die frischen Rinderseren 1:5 mit 1 m Na-Glycin-Puffer verdünnt, je ein Tropfen Serumverdünnung auf einem Objektträger mit einem Tropfen Latex-Reagenz verrührt und unter rotierender Bewegung 2 - 3 min, max. 5 min auf Agglutination beobachtet. Der Reaktionsablauf wurde durch positive (RF-haltiges Serum) und negative (RF-freies Serum) Kontrollen gesichert.

Bewertung: Auftreten einer Agglutination entspricht dem Ergebnis - Rheumafaktor positiv (s. Kap. 3.1).

2.3.2 Agglutinationstest

Prinzip: Erythrozyten wurden mit inkompletten Rh-Antikörpern verschiedener Gm-Struktur beladen und die Reaktionsfähigkeit der absorbierten Rinderseren mit diesen sensibilisierten Erythrozyten untersucht.

Vorbereitung, Sensibilisierung der Erythrozyten: Zur Beladung der frischen, gewaschenen O, D positiven Erythrozyten wurden handelsübliche Anti-D-Gm-Seren (Behringwerke, Marburg/Lahn; Biotest, Frankfurt/Main; Fresenius, Oberursel; Molter, Heidelberg) verwendet, wie sie für die Vorbereitung der Erythrozyten zur Gm(1)-, Gm(2)-, Gm(10)- und Km(1)-Bestimmung benötigt werden. Die Sensibilisierung erfolgte entsprechend den sich geringfügig unterscheidenden Vorschriften der einzelnen Hersteller. Nach Inkubation der Erythrozyten mit dem Antiserum im Brutschrank bei +37°C wurde das nicht gebundene Anti-D-Serum durch dreimaliges Waschen der Erythrozyten entfernt und das Sediment zu einer 3 %igen Aufschwemmung suspendiert. Die auf diesem Wege hergestellten Suspensionen sensibilisierter Erythrozyten wurden in den folgenden Versuchen vereinfacht als:

"Gm(1)-Erythrozyten"
"Gm(2)-Erythrozyten"
"Gm(10)-Erythrozyten"
"Km(1)-Erythrozyten"

bezeichnet.
Bei der Überprüfung der Gm-Phänotypen der Anti-D-Gm-Seren ergab sich, daß einige der als Anti-D-Gm(1) deklarierten Seren den Phänotyp Gm(1,2) aufwiesen. Die betreffenden Antiseren wurden der Herstellung von "Gm(2)-Erythrozyten" vorbehalten. "Gm(1)-Erythrozyten" wurden ausschließlich mit Antikörpern des Phänotyps Gm(1,-2) beladen.

Durchführung des Agglutinationstestes:

Material:
- Hohlschliffobjektträger in feuchter Kammer
- absorbiertes Rinderserum
- sensibilisierte/nicht sensibilisierte Erythrozyten

Ausführung: Für jedes Rinderserum wurden 5 Objektträgervertiefungen vorgesehen, auf die je 1 Tropfen verdünntes, absorbiertes Rinderserum aufgetragen und mit einem Tropfen einer der Suspensionen "Gm(1)-Erythrozyten", "Gm(2)-Erythrozyten", Gm(10)-Erythrozyten", "Km(1)-Erythrozyten" sowie "nicht sensibilisierte Erythrozyten" verrührt wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei +10°C wurde durch leichtes Neigen der Objektträger makroskopisch auf Agglutination abgelesen und in Agglutinationsstärken (0 - 4) bewertet (s. Tab. 3, Kap. 3.1).
Rinderseren, welche keine oder nur schwache Reaktionen (0 - 1) verursachten, wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

2.3.3 Agglutinationshemmtest

Prinzip: Die Rinderseren wurden im Agglutinationshemmtest mit denjenigen (sensibilisierten) Erythrozyten getestet, mit denen im Agglutinationstest mindestens eine Reaktion der Stärke 2 erfolgte. Der Einfluß einer Vorinkubation der Rinderseren mit Humanseren verschiedener Gm- und Km-Phänotypen wurde geprüft.

Material:
- wie für den Agglutinationstest
- zusätzlich ein Panel aus 40 Humanseren (1:7 verdünnt), deren Gm(1)-, Gm(2)-, Gm(10)- und Km(1)-Allotypen bekannt waren.

Kontrollen: Bei allen Agglutinations(hemm)tests wurden stets geprüft:

Humanseren + sensibilisierte Erythrozyten
(Antikörper in den Humanseren?)

Rinderseren + sensibilisierte Erythrozyten
(Reaktionsfähigkeit der absorbierten Rinderseren?)

Rinderseren + nicht sensibilisierte Erythrozyten
(vollständige Absorption der Rinderseren?)

Coombs- bzw. Anti-Gm-Serum + sensibilisierte Erythrozyten
(reaktionsfähige Sensibilisierung der Erythrozyten?)

Serum der Blutgruppe AB + sensibilisierte Erythrozyten
("Polyagglutinabilität" der Erythrozyten?)

Ansatz: 1 Tropfen Rinderserum (absorbiert, 1:4 verdünnt) und 1 Tropfen Humanserum (1:7 verdünnt) wurden vermischt, nach 5 min die Suspension sensibilisierter Erythrozyten hinzugegeben und 1 Stunde bei +10° inkubiert. Ablesung auf Agglutination (s. Tab. 3 u. 4, Kap. 3.1).

2.4 Untersuchungen zur Anti-Gm-Spezifität von zwei Rinderseren (Rs 55 und Rs 92)

Die Untersuchungen dieses Abschnittes 2.4 wurden ausschließlich mit absorbierten Rinderseren durchgeführt.

2.4.1 Differenzierte Anwendungen der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 als Anti-Gm-Seren

a) bei Reihenuntersuchungen

Rs 55: Absorbiertes Rs 55 (1:10 verdünnt; Titer des Rinderserums s. Kap. 3.2) wurde als Anti-Gm-Serum im Agglutinationshemmtest mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" bei 497 Humanseren (1:10 verdünnt) nicht verwandter Personen getestet (s. Tab. 5, 6 u. 7, Kap. 3).

Rs 92: Absorbiertes Rs 92 (1:5 und 1:25 verdünnt) wurde als Anti-Gm-Serum mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" im Agglutinationshemmtest bei 296 Humanseren (1:10 verdünnt) nicht verwandter Personen geprüft (s. Tab. 5, 6 u. 11, Kap. 3). Durch die Verdünnungen des Rinderserums sollten Prozonen erkennbar oder - beim Vorliegen mehrerer Antikörper - eine Eigenschaft austitriert werden.

Die Faktoren Gm(1), Gm(2) und Gm(10) der Humanseren wurden gleichzeitig mit herkömmlichen Anti-Gm-Seren bestimmt.

b) bei Humanseren mit seltenen Gm-Phänotypen

Für die Beurteilung der Spezifität eines Anti-Gm-Serums ist eine Überprüfung durch die Anwendung bei Humanseren (Hs) verschiedener ethnischer Gruppen bzw. bei Seren mit ungewöhnlichen Gm-Phänotypen wichtig. Bei der Auswahl der 40 Humanseren für das Suchpanel wurde diese

Tatsache zum Teil berücksichtigt (s. Tab. 5, Kap. 3.1), z.B. Serum Hs 22: Gm (17,1;-21) und Hs 34: Gm(3;-10).

In diesem Versuch wurden weitere Humanseren mit seltenen Gm-Phänotypen*: Gm(-17,-1,2,3;10) sowie Gm(-17,1, -2,3;10) mit Rs 55 und Rs 92 als Anti-Gm-Serum eingesetzt, entsprechend der bei Reihenuntersuchungen im Agglutinationshemmtest angewandten Methodik (s. Tab. 8 u. 12, Kap. 3.2).

c) bei Humanserum-Gemischen

Die inhibierende Wirkung von Gemischen aus 2 bzw. 3 menschlichen Seren verschiedener Gm-Phänotypen auf die Agglutinationsfähigkeit des Rinderserums Rs 92 wurde getestet.
Die Humanserum-Gemische wurden aus gleichen Volumenteilen 1:5 verdünnter Seren hergestellt und, wie im Agglutinationshemmtest üblich, mit Rs 92 vor Zugabe der Testerythrozyten inkubiert (s. Tab. 13, Kap. 3.2).
In weiteren Versuchen wurde Rs 92 mit zwei verschiedenen Humanseren nacheinander inkubiert, und die Reihenfolge der Zugabe der Reaktionspartner variiert, um wechselseitige Einflüsse der einzelnen Komponenten des Versuchssystems beim Reaktionsablauf verfolgen zu können: Rs 92 wurde zunächst 5 min mit dem ersten Humanserum inkubiert, dann wurde ein zweites Humanserum hinzugegeben, erneut 5 min inkubiert und die Aufschwemmung sensibilisierter Erythrozyten aufgetropft. Die Ablesung nach einer Stunde erfolgte entsprechend den Kriterien des einfachen Agglutinationshemmtests (s. Tab. 14, Kap. 3.2).

---

* Frau Dr. E. van Loghem, Amsterdam, bin ich für die Überlassung von Seren mit besonderen Gm-Phänotypen (Joh; Pie; Dav; s. Tab. 8 u. 12, Kap. 3.2) dankbar.

d) bei absorbierten Humanseren

Prinzip: Die inhibierende Wirkung von Humanseren, bei denen bestimmte Gm-Faktoren durch entsprechende Anti-Gm-Seren abgesättigt (absorbiert) wurden, auf die Agglutinationsfähigkeit von Rs 55 und Rs 92 wurde festgestellt.

Rs 55:

Vorbereitung der Humanseren: Humanseren, die den Allotyp Gm(1) besaßen, wurden mit Anti-Gm(1)-Serum abgesättigt. (Ziel: Die Gm(1)-Antikörper sollen die Gm(1)-Determinante der IgG_1-Moleküle in den Humanseren besetzen, und den Faktor Gm(1) neutralisieren. Bei erneuter Gm(1)-Bestimmung im Agglutinationshemmtest würden derartig "neutralisierte" Humanseren wie Gm(-1) erscheinen, d.h., sie inhibieren nicht mehr.)
Für den Vorversuch im Agglutinationstest wurden Humanseren (1:10 verdünnt) der Phänotypen Gm(1,-2) oder Gm(1,2) mit steigenden Mengen eines hochtitrigen, käuflichen Anti-Gm(1)-Serums (Biotest, Frankfurt/Main; lyophilisiert, aufgelöst mit 1/4 des vorgesehenen Volumens Aqua dest.) gemischt (s. Abb. 1a, 1b).
Ansatz des Vorversuches:

Humanserum Hs	Zugabe von Anti-Gm(1)-Serum in Volumenteilen zu einem Teil Hs (1:10 verdünnt)			
Nr. Phänotyp	+ 0,5	+ 0,75	+ 1,0	+ 1,5
1 Gm(1,-2)	0	0	0	2
2 Gm(1,-2)	0	0	0-1	2
38 Gm(1,-2)	0	0	0-1	2
4 Gm(1, 2)	0	0	0	2
24 Gm(1, 2)	0	0	0	1

(Reaktionsstärken 0 - 4)

Nach der Inkubation der Humanserum-Anti-Gm-Serum-Gemische mit "Gm(1)-Erythrozyten" wurde dasjenige Konzentrationsverhältnis festgestellt, wo gerade noch keine Agglutination sichtbar war.
Ergebnis aus dem Vorversuch:
Der Ansatz "1 + 1" aus einem Teil Humanserum (1:10 verdünnt) und einem Teil Anti-Gm(1)-Serum (4fach konzentriert) wurde für den Agglutinationshemmtest mit absorbierten Humanseren verwandt; die Endverdünnung des Humanserums betrug 1:20. Die überprüfende Gm(1)-Bestimmung im Hemmtest mit "neutralisierten" Humanseren ergab eine Aufhebung der Inhibitionswirkung. Bei der Gm(2)-Bestimmung zeigte sich bei den Humanseren Hs 4 und Hs 24 nach Absorption mit Anti-Gm(1)-Serum nach wie vor eine Hemmung des Anti-Gm(2)-Serums.

Durchführung des Agglutinationshemmtestes mit absorbierten Humanseren und Rs 55 als Anti-Gm-Serum:

1 Tropfen Rs 55 (absorbiert, 1:4 verdünnt) und 1 Tropfen Humanserum-Anti-Gm(1)-Serum-Gemisch (siehe Vorversuch) wurden auf Hohlschliffobjektträgern verrührt, nach 5 min 1 Tropfen "Gm(1)-Erythrozyten" zugegeben und nach einer Stunde auf Agglutination abgelesen (s. Abb. 1c, 1d u. Kap. 3.1, Tab. 9).
Voraussetzung für die Bewertung des Testergebnisses war eine Überprüfung der Inhibitionsfähigkeit von 1:20 verdünnten Humsanseren. Durch den Kontrollansatz (Humanseren, 1:20 verdünnt, ohne Anti-Gm(1)-Serum-Zusatz) konnte dieses gesichert werden.

Rs 92:

Die Vorbereitung der Humanseren erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die Testung mit Rs 55: Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) wurden mit Anti-Gm(1)- bzw. Anti-Gm(2)-Serum oder mit beiden Anti-Gm-Seren in ansteigender Konzentration behandelt.
Bei der Durchführung des Vorversuches erwies sich der niedrige Titer der Anti-Gm(2)-Seren (Biotest, Frankfurt/Main; lyophilisiert, aufgelöst mit 1/4 der vorgesehenen Menge Aqua dest., geringere Volumina brachten das Lyophilisat nicht mehr in Lösung) als problematisch. Die Anti-Gm(2)-Seren neutralisierten die Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) nicht so weitgehend, daß keine Gm(2)-Substanz mehr nachweisbar war, ohne gleichzeitig zur Ausdünnung der hemmenden Eigenschaft Gm(2) zu führen.
Außerdem stellte sich heraus, daß das Anti-Gm(2)-Serum selbst den Allotyp Gm(1) besaß, d.h., es hemmte Anti-Gm(1)-Seren.
Unter diesen Vorbehalten wurden die ausgetesteten, unvollständig absorbierten Humanseren verwendet und mit Rs 92 als Anti-Gm-Serum und "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" im Agglutinationshemmtest eingesetzt s. Tab. 15, Kap. 3.2).

Abb. 1a - 1d Schematische Darstellung des Versuches 2.4.1.d mit Rinderserum Rs 55

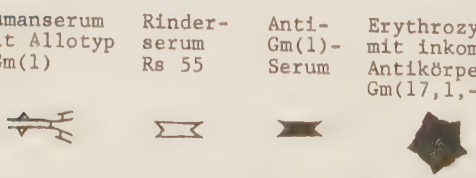

Abb. 1a Zeichenerklärung

Schematische Darstellung des Versuches 2.4.1.d mit Rs 55

Humanserum mit Allotyp Gm(1), absorbiert mit Anti-Gm(1)-Serum

Humanserum mit Allotyp Gm(1) nativ, verdünnt mit NaCl-Lösung

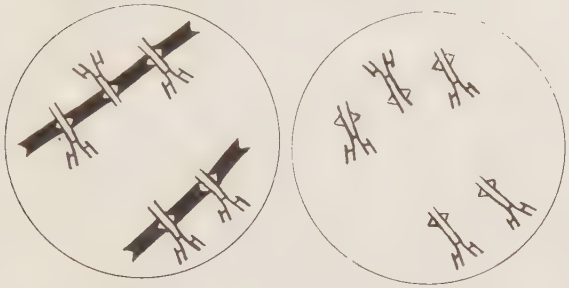

Abb. 1b

Absättigung des Humanserums mit Anti-Gm-Serum

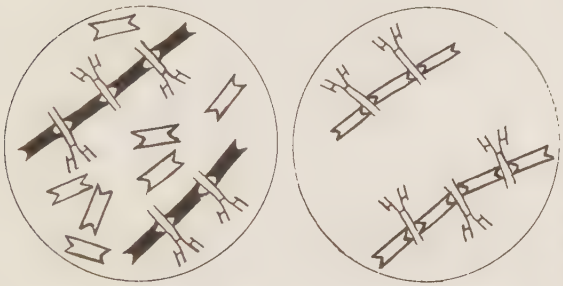

Abb. 1c

Inkubation mit Rs 55

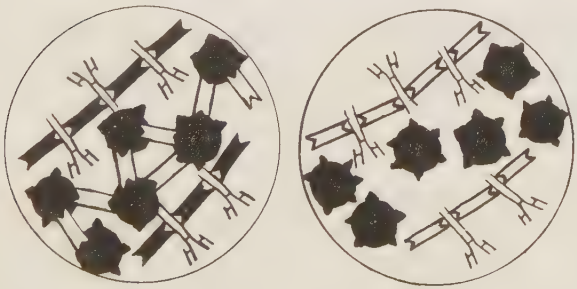

Abb. 1d

Reaktionsergebnis nach Zugabe der Testerythrozyten

Agglutination

Inhibition

2.4.2 Gm-Bestimmungen bei Humanseren nach Absorption mit Rinderserum Rs 55 bzw. Rs 92

Prinzip: Für diesen Versuch wurden Humanseren mit Rs 55 oder Rs 92 absorbiert, und das Verhalten der so behandelten Humanseren bei Gm(1)- und Gm(2)-Bestimmungen beobachtet.

Rs 55:

Humanseren, die den Faktor Gm(1) besaßen, wurden im Vorversuch in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen mit Rs 55 (absorbiert, unverdünnt) gemischt und diese Rinderserum-Humanserum-Gemische soweit ausgetestet, bis gerade kein Rinderserum-Überschuß vorlag, d.h. keine Agglutination der "Gm(1)-Erythrozyten" stattfand. Mit diesen absorbierten Humanseren (= Rinderserum-Humanserum-Gemische) wurden nun Gm(1)-Bestimmungen im üblichen Agglutinationshemmtest durchgeführt (s. Kap. 3.2, Tab. 9).

Rs 92:

Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) wurden mit Rs 92 (absorbiert, unverdünnt), wie bei Rs 55 beschrieben, abgesättigt.
Die ausgetesteten Rinderserum-Humanserum-Gemische wurden im Agglutinationshemmtest zur Gm(1)- und Gm(2)-Bestimmung eingesetzt (s. Kap. 3.2).

2.4.3 Darstellung verschiedener Reaktionseigenschaften der Rinderseren Rs 55 und Rs 92

Titer:

Die Titer der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 gegen "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" wurden im Agglutinationstest bestimmt.
Im Agglutinationshemmtest wurde geprüft, bis zu welcher Verdünnung bestimmte Humanseren ihre inhibierende Wirkung auf die Agglutinationsfähigkeit des Rinderserums Rs 55 ausübten.

Lagerungsstabilität:

Die Agglutinationsfähigkeit der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 nach Lagerung über einen Zeitraum von 10 Monaten bei +4°C und -28°C wurde beobachtet.

Reaktionstemperatur:

Mehrere Ansätze des Agglutinationstestes mit Rs 55 bzw. Rs 92 und sensibilisierten Erythrozyten wurden bei +4°C, +20°C oder +37°C inkubiert und das Reaktionsoptimum (größte Reaktionsstärke) bestimmt.

Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen:

Prinzip: Behandlung von IgM-Antikörpern mit 2-Mercaptoethanol (unter schonenden Bedingungen) bewirkt eine Zerstörung der Disulfid-Brücken des Antikörper-Moleküls und damit verbundene Aufhebung der Agglutinationsfähigkeit. Entsprechende Behandlung von IgG-Antikörpern hat diesen Effekt nicht (16). - Die Rinderseren Rs 55 und Rs 92 wurden mit 2-Mercaptoethanol inkubiert und anschließend ihre Reaktionsfähigkeit mit sensibilisierten Erythrozyten erneut untersucht.

Durchführung: Ansatz:

0,100 ml unverdünntes Rinderserum
+ 0,001 ml (15 mmol) 2-Mercaptoethanol
Die Ansätze sowie Kontrollen (Rs 55 bzw. Rs 92 ohne Mercaptoethanol-Zusatz sowie Humanserum mit Mercaptoethanol) wurden 1 Stunde bei +37°C inkubiert. Die inkubierten Rinderseren wurden mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" getestet. Ein störender Einfluß des Inkubationsvorganges oder der Substanz Mercaptoethanol konnte durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden.

Reaktionsfähigkeit nach Enzymbehandlung:

Prinzip:
Porter (32) und Nisonoff (28) konnten durch Papainbehandlung (+ Cystein) von Immunglobulinen die Antikörpermoleküle in zwei Fab- und ein Fc-Fragment spalten. Die Fab-Fragmente waren noch Antigen-bindend, nicht aber agglutinierend oder Komplement-bindend; sie stellten blockierende Antikörper dar.
In Anlehnung an die Methodik von Porter und Nisonoff (32,28) wurden die Rinderseren mit Papain behandelt und danach erneut auf ihre Agglutinationsfähigkeit mit sensibilisierten Erythrozyten getestet.

Durchführung: Papain (Biotest, Frankfurt/Main; lyophilisiert, vorgesehen zur Auflösung mit 2 ml Aqua dest.) wurde gelöst mit 1 ml 0,1 m Phosphatpuffer, welcher 0,1 % Cystein und 0,38 % EDTA enthielt.
Ansatz: 0,1 ml Rinderserum + 0,1 ml Papain-Lösung
Kontrollen: 0,1 ml Rinderserum + 0,1 ml NaCl-Lösung
bzw. 0,1 ml Humanserum + 0,1 ml Papain-Lösung
Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei +37°C wurden zu den Reaktions- und Kontrollansätzen 0,4 ml 0,005 m Jodbenzoat in 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben, um die Enzymaktivität zu stoppen.

Die Reaktionsfähigkeit der Papain-behandelten Rinderseren Rs 55 und Rs 92 wurde mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" überprüft; durch Testung der Kontrollansätze war die Erkennung von möglicherweise falsch positiven oder falsch negativen Reaktionsergebnissen gesichert.
Nach der Inkubation mit Enzym-behandeltem Rinderserum wurden die sensibilisierten Erythrozyten auf ihre Reaktionsfähigkeit mit Anti-Gm(1)- und Anti-Gm(2)-Serum getestet. Die Agglutination nicht vorinkubierter Testerythrozyten durch gleiche Anti-Gm-Serum-Konzentrationen wurde kontrolliert.

Untersuchung auf präzipitierende Eigenschaften:

Um mögliche präzipitierende Antikörper in den Rinderseren Rs 55 und Rs 92 nachzuweisen, wurden Versuche nach der Methode der radialen Immundiffusion (Ouchterlony) mit verschiedenen Humanseren und Rs 55 bzw. Rs 92 als Antiserum angesetzt.
Außerdem wurden Immunelektrophoresen (Barbitalpuffersystem) mit verschiedenen Humanseren in Agargel durchgeführt und der Mittelkanal mit Rs 55 bzw. Rs 92 gefüllt. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubationszeit wurde auf Bildung von Präzipitationslinien abgelesen.
Die Bewertung der beschriebenen Untersuchungen erfolgte nur bei korrektem Ausfall von positiven und negativen Kontrollen (bekannte Kontroll- und Antiseren, Bildung von Präzipitaten usw.).

Reaktionen mit Protein A von Staphylococcus aureus:

Prinzip: Nagai et al beschrieben 1982 die Hemmung einer Gm-Reaktion durch Protein A (27), einem Zellwandprotein von Staphylococcus aureus. Mit inkompletten Rh-Antikörpern beladene Erythrozyten wurden nach Behandlung mit

Protein A nicht mehr durch die entsprechenden Anti-Gm-Seren agglutiniert.
Die Reaktion der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 mit derartigen sensibilisierten, mit Protein A behandelten Erythrozyten sollte getestet werden.

Durchführung: Frische O, D positive Erythrozyten wurden wie üblich mit inkompletten Anti-D-Gm(1)- bzw. Anti-D-Gm(2)-Seren inkubiert, dreimal gewaschen und dann nach der Methode von Nagai et al (26) mit Protein-A-Lösung behandelt: (Protein A, lyophilisiert; Calbiochem, Frankfurt/Main; Serva, Heidelberg; gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung, Konzentration 2,5 mg/ml). Ein Volumenteil 50 %ige Suspension sensibilisierter Erythrozyten wurde mit einem Teil Protein-A-Lösung gemischt und 30 min bei +37°C inkubiert. Anschließend wurden die sensibilisierten, mit Protein A behandelten Erythrozyten dreimal gewaschen. Eine 3 %ige Suspension dieser präparierten Erythrozyten wurde dann mit Rs 55 und Rs 92 wie im Agglutinationstest getestet. Die Reaktionseigenschaften der sensibilisierten, mit Protein A behandelten Erythrozyten wurden durch Ansätze in verschiedenen Testmilieus (NaCl-Lösung, 22 %iges Rinderalbumin, Antihumanglobulin-freie Rinderseren, Humanseren, Coombsseren, Anti-Gm-Seren etc.) untersucht.
Nicht sensibilisierte Erythrozyten verschiedener Spender, O D positiv und andere Blutgruppen, wurden ebenfalls mit Protein-A-Lösung inkubiert, um einen Einfluß der Behandlung mit Protein A auf die Reaktionseigenschaften von Erythrozyten erkennen zu können.

3. Ergebnisse

3.1 Antihumanglobulin-Aktivitäten in Rinderseren

Untersuchungen im Rheumafaktor-Latex-Test (vgl. S. 8)

Bis 3 min. Reaktionszeit:
keine sichtbare Reaktion der Rinderseren mit den präparierten Latexteilchen

nach 5 min Reaktionszeit:
Die Mehrzahl der getesteten Rinderseren zeigte eine zunehmend starke Agglutination der Latexpartikel; diese Reaktion wurde als unspezifisch bewertet.

Agglutinationstest (vgl. S. 9 - 10)

Ergebnisse nach mehrfachem Versuchsansatz siehe Tabelle 3.

Nach Ausschluß der Rinderseren, die keine oder nur schwache Reaktionen (0 - 1) verursachten, wurden die verbleibenden 45 Rinderseren für weitere Untersuchungen im Agglutinationshemmtest verwendet.
Die Reaktionen dieser 45 Rinderseren waren im Agglutinationstest am häufigsten und deutlichsten mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" festzustellen. Agglutinationen von "Gm(10)-" und "Km(1)-Erythrozyten" fanden sich, wenn überhaupt, nur bei solchen Rinderseren, die "Gm (1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" gleichfalls agglutinierten. Die Reaktionsstärken mit "Gm(10)-" und "Km(1)-Erythrozyten" erreichten höchstens die Intensität der Agglutination von "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten".

Agglutinationsstärke	Erythrozyten-Suspensionen "Gm(1)-"	"Gm(2)-"	"Gm(10)-"	"Km(1)-"	O-Ery.
0	134	162	163	169	203
1	24	18	23	16	0
2	8	9	7	6	0
3	23	6	7	9	0
4	14	8	3	3	0
Summe Rinderseren	203	203	203	203	203

Tab. 3 Ergebnisse des Agglutinationstestes Reaktionshäufigkeit und -stärke der 203 Rinderseren (absorbiert) mit verschiedenen sensibilisierten Erythrozyten und nicht sensibilisierten Erythrozyten (O-Ery.).

Agglutinationshemmtest (vgl. S. 11)

Die Ergebnisse des Agglutinationshemmtestes mit verschiedenen Humanseren (Hs) bei den 45 Rinderseren, die im Agglutinationstest Antihumanglobulin-Eigenschaften gezeigt hatten, wurden in Tab. 4 verschiedenen Reaktionsmustern zugeordnet. In den Fällen, in denen Rinderseren mit verschiedenen sensibilisierten Erythrozyten getestet wurden, unterschieden sich die Ergebnisse bei den einzelnen Erythrozytensuspensionen nur geringfügig, so daß die Reaktionen in der Tabelle nicht nach Testerythrozyten differenziert wurden. - Eine Ausnahme bildet das Rinderserum Rs 92, das entsprechend seiner Reaktionen mit "Gm(2)-Erythrozyten" unter c) eingeordnet wurde, obwohl die Ergebnisse mit "Gm(1)-Erythrozyten" abweichend waren.

Beschreibung der Reaktion: - Agglutination/Inhibition - Agglutinationsstärke (0 - 4)	Anzahl der Rinderseren
a) keine Inhibition durch Hs	1
b) gleichmäßige Abschwächung der Agglutination durch alle Hs (stets 2 - 3)	5
c) vollständige Inhibition durch einige Hs/keine Inhibition durch die übrigen Hs (0 oder 4)	2*
d) vollständige, partielle oder keine Inhibition durch verschiedene Hs (0 bis 4)	6
e) starke bis vollständige Inhibition durch alle Hs (0 - 1 -2)	31
Summe Rinderseren:	45

* es handelt sich um die Rinderseren Rs 55 und Rs 92.

Tab. 4 Reaktionsmuster von 45 Rinderseren im Agglutinationshemmtest mit verschiedenen Humanseren (Hs)

Die Rinderseren Rs 55 und Rs 92 zeigten im Agglutinationshemmtest mit 40 Humanseren differenzierbare Reaktionen. Die einzelnen Ergebnisse dieser Rinderseren sind in den Tabellen 5 und 6 ausführlich dargestellt.

Hs	Phänotyp				"Gm(1)-Erythro-zyten"		"Gm(2)-Erythro-zyten"	
Nr	Gm(1)	(2)	(10)	Km(1)	Rs 55	Rs 92	Rs 55	Rs 92
1	+	-	+	-	0	0	0	4
2	+	-	-	-	0	1	0	4
3	+	+	-	-	0	0	0	0
4	+	+	-	-	0	0	0	0
5	+	+	-	-	0	0	0	0
6	+	+	-	-	0	0	0	0
7	+	-	-	-	0	0	0	4
8	+	-	+	-	0	2	0	4
9	+	+	-	-	0	0	0	0
10	+	+	+	+	0	0	0	0
11	+	+	-	-	0	0	0	0
12	+	-	-	-	0	0	0	4
13	+	-	+	+	0	2	0	4
14	+	+	-	-	0	0	0	0
15	-	-	+	-	4	4	4	4
16	-	-	+	-	4	4	4	4
17	-	-	+	-	4	4	4	4
18	+	-	+	-	0	2	0	4
19	+	-	+	-	0	0	0	4
20	+	-	+	-	0	0	0	4
21	-	-	+	-	4	4	4	4
22*	+	-	+	-	0	2	0	4
23	+	-	+	-	0	1	0	4
24	+	+	+	-	0	0	0	0
25	-	-	+	-	4	4	4	4
26	+	-	+	-	0	1	0	4
27	+	-	-	-	0	0	0	4
28	+	-	+	-	0	1	0	4
29	+	-	+	+	0	2	0	4
30	+	-	+	-	0	2	0	4
31	+	-	+	-	0	2	0	4
32	+	-	+	-	0	1	0	4
33	+	-	-	+	0	2	0	4
34**	+	+	-	-	0	0	0	0
35	-	-	+	-	4	4	4	4
36	-	-	+	-	4	4	4	4
37	-	-	+	+	4	4	4	4
38	+	-	+	-	0	2	0	4
39	+	-	+	-	0	1	0	4
40	+	-	+	-	0	0	0	4

Tab. 5 Ergebnisse des Agglutinationshemmtestes in Reaktionsstärken (0 - 4) bei Anwendung von Rs 55 und Rs 92 (absorbiert, 1:4 verdünnt) mit "Gm(1)-" bzw. "Gm(2)-Erythrozyten" und 40 Humanseren (Hs) bekannter Gm(1)-, Gm(2)-, Gm(10)- und Km(1)-Typen.

* Hs 22: Gm(-21) ** Hs 34: Gm(+3)

Phänotyp der Humanseren	"Gm(1)-Erythrozyten"	"Gm(2)-Erythrozyten"
Rs 55		
Gm(1,2;10)	Hemmung	Hemmung
Gm(1,2;-10)	Hemmung	Hemmung
Gm(1,-2;10)	Hemmung	Hemmung
Gm(1,-2;-10)	Hemmung	Hemmung
Gm(-1,-2;10)	keine Hemmung	keine Hemmung
Rs 92		
Gm(1,2;10)	Hemmung	Hemmung
Gm(1,2;-10)	Hemmung	Hemmung
Gm(1,-2;10)	Abschwäch./Hemm.	keine Hemmung
Gm(1,-2;-10)	Abschwäch./Hemm.	keine Hemmung
Gm(-1,-2;10)	keine Hemmung	keine Hemmung

Tab. 6 Reaktionen der Rinderseren Rs 55 und Rs 92 mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" bei Humanseren verschiedener Gm-Phänotypen; die Ergebnisse waren übereinstimmend für Humanseren mit Km(1) und Km(-1).

3.2 Reaktionsverhalten der Rinderseren Rs 55 und Rs 92

a) Rinderserum Rs 55:

Rs 55 agglutinierte Erythrozyten, die mit Anti-D-Gm(1)- oder Anti-D-Gm(2)-Serum sensibilisiert wurden, sehr deutlich. Im Agglutinationshemmtest waren die Reaktionen bei allen getesteten Humanseren unabhängig davon, ob "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" verwendet wurden.

32 der getesteten 40 Humanseren des Panels führten zur vollständigen Inhibition der Agglutinationsfähigkeit; diesen Seren war die Eigenschaft Gm(1) und Gm(17) gemeinsam, die in verschiedenen Kombinationen mit den Faktoren Gm(2), Gm(10) und Km(1) vorlag. Die 8 Humanseren, welche die Agglutination nicht hemmten, wiesen alle den Phänotyp Gm(-1,-2;10) auf. - Bei den Reihenuntersuchungen (s. Tab. 7) mit 497 Humanseren und Rs 55 als Anti-Gm-Serum im Agglutinationshemmtest hemmten ebenfalls die 254 Humanseren, die den Faktor Gm(1) besaßen, die Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten.

Humanseren Phänotyp	Humanseren Anzahl	Reaktionsstärke
Gm(1,2;10)	69	0
Gm(1,2;-10)	17	0
Gm(1,-2;10)	144	0
Gm(1,-2;-10)	24	0
Gm(-1,-2;10)	243	4
Gesamt	497	

Tab. 7 Reaktionsergebnisse des Agglutinationshemmtests mit Rs 55 als Anti-Gm-Serum und "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Die 243 Humanseren mit dem Phänotyp Gm(-1,-2;10) führten nicht zur Agglutinationshemmung; Fehlen des Faktors Gm(1) war also verbunden mit fehlender Inhibitionsfähigkeit.

Die Verwendung von Humanseren mit ungewöhnlichen Gm-Phänotypen im Agglutinationshemmtest und Rs 55 als Anti-Gm-Serum zeigte, daß die Seren mit dem bei Mongoliden vorkommenden Phänotyp Gm(-17,1) die Agglutination der "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" (sensibilisiert mit Gm(17,1) bzw. mit Gm(17,1,2)) ebenso hemmten wie die 254 getesteten Humanseren mit dem europiden Gm-Typ, welche den Faktor Gm(1) stets gekoppelt mit Gm(17) aufweisen (s. Tab. 8). Die Testung der Seren mit dem seltenen Phänotyp Gm(-17,-1,2) ergab wie bei Seren des Typs Gm(-17,-1,-2) keine Hemmung der Agglutination.

Humanserum Nr. (1:10 verdünnt)	Phänotyp	Reaktion
141 Joh	Gm(-17,1,-2,3;10)	0
142 Pie	Gm(-17,1,-2,3;10)	0
143 Dav	Gm(-17,-1,2,3;10)	4
144 Pyt	Gm(-17,-1,2,3;10)	4
56 Hof	Gm(-17,-1,2,3;10)	4

Tab. 8 Reaktionsergebnisse des Agglutinationshemmtestes mit Rs 55 als Anti-Gm-Serum und "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" bei Hs mit seltenen Gm-Phänotypen; Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Nach Absorption von Humanseren, die den Allotyp Gm(1) besaßen, mit Anti-Gm(1)-Serum, verloren diese Seren ihre ursprünglich vorhandene Inhibitionswirkung: Die Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten durch Rs 55 wurde nicht mehr gehemmt (s. Tab. 9). Die festgestellte Abschwächung der Agglutination um 1 - 2 Stufen wäre durch die nur annähernd vollständige Absättigung der Humanseren zu erklären. - Die unbehandelten ver-

dünnten Humanseren konnten die Agglutinationsfähigkeit des Rinderserums Rs 55 inhibieren. Kontrollansätze dieser verdünnten bzw. "neutralisierten" Humanseren im üblichen Agglutinationshemmtest mit Anti-Gm(1)-Serum zeigten gleiche Reaktionsausfälle wie mit Rs 55. Eine Austestung der absorbierten Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) im Agglutinationshemmtest zur Gm(2)-Bestimmung ergab, daß die Anti-Gm(2)-Seren unverändert gehemmt wurden.

Humanserum (Hs) Nr.	Phänotyp	Hs, abgesättigt mit Anti-Gm(1)-Serum (Hs-Verdünn. 1:20)	Hs, verdünnt mit NaCl-Lösung 1:20
1	Gm(1,-2)	2	0
2	Gm(1,-2)	3	0
38	Gm(1,-2)	3	0
4	Gm(1, 2)	2	0
24	Gm(1, 2)	1 - 2	0

Tab. 9 Reaktionen des Rinderserums Rs 55 mit "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" nach Inkubation mit absorbierten bzw. unbehandelten Humanseren im Agglutinationshemmtest (s. Kap. 2.4.1 d).
Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Humanseren des Phänotyps Gm(1,-2) oder Gm(1,2), die nach Absorption mit Rinderserum Rs 55 einer Gm(1)-Bestimmung im Agglutinationshemmtest unterzogen wurden, reagierten wie Humanseren mit Gm(-1), d.h., sie hemmten die Agglutination von "Gm(1)-Erythrozyten" durch Anti-Gm(1)-Serum nicht mehr, während entsprechende Verdünnungen unbehandelter Humanseren zur vollständigen Hemmung der Reaktion ausreichten (s. Tab. 10).

Humanserum Nr.	Phänotyp	Humanserum, absorbiert mit Rs 55	Humanserum, verdünnt mit NaCl-Lösung
1	Gm(1,-2)	2	0
2	Gm(1,-2)	3	0
38	Gm(1,-2)	3	0
4	Gm(1, 2)	3	0
24	Gm(1, 2)	2	0

Tab. 10 Reaktionsergebnisse bei der Gm(1)-Bestimmung im Agglutinationshemmtest mit Humanseren nach Behandlung mit Rs 55 und mit unbehandelten Humanseren (Endverdünnung der Humanseren jeweils 1:20)
Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Der Agglutinationstiter des Rinderserums Rs 55 gegen "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" lag bei 1:100; Verdünnungen von 1:10 bis 1:20 für den Einsatz als Anti-Gm-Serum im Agglutinationshemmtest erwiesen sich als günstig. Humanseren, die den Faktor Gm(1) besaßen, hemmten die Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten durch Rs 55 bis zu einer Verdünnung von 1:80 bis 1:100. Humanseren mit Gm(-1) führten weder verdünnt noch nativ zur Abschwächung der Agglutinationsstärke des Rinderserums.

Nach Lagerung des Rinderserums Rs 55 über 4 Monate bei +4°C oder 10 Monate bei -28°C war keine Abschwächung des Agglutinationstiters zu beobachten.
Das Reaktionsoptimum lag (ebenso wie bei Anti-Gm-Seren menschlicher Herkunft) im Temperaturbereich von +4°C bis +12°C, während bei +37°C keine nennenswerte Agglutination der Erythrozyten erfolgte.

Nach Behandlung des Rinderserums mit Mercaptoethanol oder Papain war die Agglutinationsfähigkeit mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" nicht mehr nachweisbar. Die Kontrollansätze der sensibilisierten Erythrozyten mit Anti-Gm(1)-Serum zeigten wie üblich starke Agglutinationen, jedoch konnten die Testerythrozyten im Anschluß an eine Inkubation mit papainisiertem Rs 55 durch Anti-Gm(1)-Serum nicht mehr zur Agglutination gebraucht werden (Anti-Gm(2)-Serum führte unverändert zur Agglutination der "Gm(2)-Testerythrozyten").
Bei der radialen Immundiffusion und bei Immunelektrophoresen stellten sich keine präzipitierenden Antikörper des Rinderserums Rs 55 gegenüber Substanzen im menschlichen Serum oder Plasma dar.

Die Reaktionsergebnisse der Versuche mit Protein A werden am Ende dieses Abschnittes 3.2 zusammenfassend für Rs 55 und Rs 92 erläutert.

b) Rinderserum Rs 92:

Rs 92 agglutinierte Erythrozyten, die mit Antikörpern der Struktur Gm(1,-2) oder Gm(1,2) beladen waren; mit "Gm(2)-Erythrozyten" zeigten sich jedoch stärkere Reaktionen.
Im Agglutinationshemmtest ergaben "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" unterschiedliche Reaktionsergebnisse:
8 der 40 Humanseren des Panels bewirkten eine komplette Hemmung der Reaktion mit "Gm(2)-Erythrozyten"; diese 8 Humanseren besaßen den Phänotyp Gm(1,2). Die übrigen 32 Humanseren mit anderen Gm-Faktoren inhibierten die Agglutination der "Gm(2)-Erythrozyten" nicht. - Die Agglutination der "Gm(1)-Erythrozyten" durch Rs 92 wurde von den gleichen 8 Humanseren sowie 8 weiteren Seren mit dem Phänotyp Gm(1,-2) gehemmt, die übrigen

26 Seren des Typs Gm(1,-2) führten zu einer partiellen Hemmung. Die 8 Humanseren des Phänotyps Gm(-1,-2) hemmten die Agglutination hingegen nicht.
Die Ergebnisse bei Reihenuntersuchungen von 296 Humanseren im Agglutinationshemmtest mit Rs 92 als Anti-Gm-Serum entsprachen den Reaktionen des Panels (s. Tab. 11):

Humanseren		"Gm(1)-Erythrozyten"		"Gm(2)-Erythrozyten"	
Anzahl	Gm-Phänotyp				
Rs 92 verdünnt:		1:5	1:25	1:5	1:25
58	(1,2,10) (1,2,-10)	0	0	0	0
155	(1,-2,10 (1,-2,-10)	0-1-2-(3)	0-1-(2)	4	4
83	(-1,-2,10)	4	3-4	4	4
296					

Tab. 11 Reaktionen des Rs 92 (1:5 und 1:25 verdünnt) als Anti-Gm-Serum im Agglutinationshemmtest mit "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten". Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) hemmten die Agglutination von "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" stets und vollständig, Humanseren des Phänotyps Gm(-1,-2) verursachten in keinem Fall Agglutinationsabschwächung. Die Humanseren, die den Allotyp Gm(1), nicht aber Gm(2) besaßen, inhibierten die Agglutination der "Gm(2)-Erythrozyten" durch Rs 92 nicht, die Reaktion mit "Gm(1)-Erythrozyten" wurde abgeschwächt oder gehemmt.

Die Agglutination der "Gm(1)-Erythrozyten" durch Rs 92 erfolgte bei verschiedenen, zur Sensibilisierung verwendeten Anti-D-Gm(1)-Seren mit unterschiedlicher Reaktionsstärke. Entsprechend war die Hemmung durch Humanseren des Phänotyps Gm(1,-2) bei einigen "Gm(1)-Erythrozyten" fast stets komplett, bei anderen hingegen häufiger unvollständig.
Die Anwendung des Rs 92 in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen ergab keine qualitativen Veränderungen des Reaktionsmusters.
Die Inhibition der Agglutinationsfähigkeit des Rinderserums durch Humanseren mit den ungewöhnlichen Phänotypen Gm(-17,-1,2) oder Gm(-17,1,-2) entsprach der Inhibitionswirkung durch Seren des Phänotyps Gm(17,1-2): Sie hemmten die Agglutination von "Gm(2)-Erythrozyten" nicht erkennbar bzw. diejenige von "Gm(1)-Erythrozyten" nicht vollständig (s. Tab. 12).

Humanseren Nr.	Phänotyp	"Gm(1)-Erythrozyten"	"Gm(2)-Erythrozyten"
141 Joh	Gm(-17,1,-2)	1	4
142 Pie	Gm(-17,1,-2)	1	4
143 Dav	Gm(-17,-1,2)	1-2	4
144 Pyt	Gm(-17,-1,2)	1	4
56 Hof	Gm(-17,-1,2)	1-2	4

Tab. 12 Reaktionsergebnisse des Agglutinationshemmtestes mit Rs 92 (1:5 verdünnt) als Anti-Gm-Serum und "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten bei Hs mit seltenen Gm-Phänotypen.
Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Humanseren des Phänotyps Gm(17,1,2) hemmten, wie bereits beschrieben, stets die Agglutination von "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" durch Rs 92. Humanserum-Gemische (z.B. aus einem Serum des Phänotyps Gm(-17,-1,2) und einem Serum mit Gm(17,1,-2)), welche in ihrer Zusammensetzung die Faktoren Gm(17), Gm(1) und Gm(2) aufwiesen, führten dagegen nicht zur Hemmung (s. Tab. 13). Der Reaktionsausfall im Agglutinationshemmtest bei Humanserum-Gemischen entsprach der hemmenden Wirkung desjenigen sich im Gemisch befindlichen Humanserums mit der stärksten Inhibitionsfunktion.

Phänotyp der Humanseren im Gemisch	"Gm(1)-Erythrozyten"	"Gm(2)-Erythrozyten"
Gm(-17,-1,2) + Gm(17,1,-2)	1	4
Gm(-17,-1,2) + Gm(-17,1,-2)	1	4
Gm(-17,-1,2) + Gm(-17,1,-2) + Gm(17,1,-2)	1	4
Gm(17,1,-2) + Gm(17,1,2)	0	0

Tab. 13 Reaktionsergebnisse des Agglutinationshemmtestes bei Humanserum-Gemischen mit Rs 92 (1:5 verdünnt) als Anti-Gm-Serum und "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten".

Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Bei Inkubation des Rinderserums Rs 92 nacheinander mit zwei verschiedenen Humanseren waren die Reaktionen im Agglutinationshemmtest unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe der Humanseren zum Rinderserum (s. Tab. 14). Wurde Rs 92 zuerst mit einem Humanserum zusammengebracht, welches alleine zu einer inkompletten Hemmung der Agglutinationsfähigkeit führen würde, konnte durch nachfolgende Inkubation mit einem Serum des Phänotyps Gm(17,1,2) unverändert eine vollständige Inhibition erreicht werden, eine Behinderung der Hemmungsreaktion durch die vorangehende Inkubation war nicht zu erkennen.

Phänotypen 1. Humanserum 2. Humanserum	"Gm(1)-Erythrozyten"	"Gm(2)-Erythrozyten"
1. Gm(-17,-1,2) 2. Gm(17,1,2)	0	0
1. Gm(17,1,-2) 2. Gm(17,1,2)	0	0
1. Gm(17,1,-2) 2. Gm(17,1,2)	0	0
1. Gm(17,1,-2) 2. Gm(-17,-1,2)	1	4
1. Gm(-17,-1,2) 2. Gm(17,1,-2)	1	4

Tab. 14 Reaktionen im Agglutinationshemmtest nach Inkubation des Rs 92 (1:5 verdünnt) mit zwei verschiedenen Humanseren hintereinander und "Gm(1)-" u. "Gm(2)-Erythrozyten", Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Nach Absättigung von Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) mit Anti-Gm(1)-Serum hemmten diese menschlichen Seren die Agglutination von "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" durch Rs 92 nicht mehr vollständig; sie bewirkten nur eine Abschwächung der Agglutinationsstärke.
Nach Absättigung mit Anti Gm(2)-Serum bzw. mit Anti-Gm(2)- und Anti-Gm(1)-Serum hingegen inhibierten diese Seren des Phänotyps Gm(1,2) die Agglutination der Testerythrozyten durch Rs 92 ebenso vollständig wie vor der Behandlung (s. Tab. 15). - Als Erklärung dieser Ergebnisse wird auf die im methodischen Teil (s. Kap. 2.4.1 d) bereits erwähnte ungenügende Neutralisation des Faktors Gm(2) und das Vorliegen der Eigenschaft Gm(1) im Anti-Gm(2)-Serum verwiesen.

Humanseren (Hs) des Phänotyps Gm(17,1,2)	"Gm(1)-Erythrozyten"	"Gm(2)-Erythrozyten"
Hs, 1:20 verdünnt	0	0
Hs, absorbiert mit Anti-Gm(1)-Serum	2	3
Hs, absorbiert mit Anti-Gm(2)-Serum	0*	0*
Hs, absorbiert mit Anti-Gm(1)- und Anti-Gm(2)-Serum	0*	0*

* Reaktionsergebnisse bei unvollständiger Neutralisation des Faktors Gm(2) und Einfluß durch den Allotyp Gm(1) des Anti-Gm(2)-Serums.

Tab. 15 Reaktionen im Agglutinationshemmtest mit Rs 92 (1:5 verdünnt) als Anti-Gm-Serum bei absorbierten Hs (abgesättigt mit Anti-Gm-Seren) und "Gm(1)-" u. "Gm(2)-Erythrozyten"
Reaktionsstärke 0 - 4, 0 = Hemmung = keine Agglutination

Humanseren des Phänotyps Gm(1,2), welche mit Rinderserum Rs 92 absorbiert wurden, reagierten bei der nachfolgenden Gm-Bestimmung im Agglutinationshemmtest mit üblichen Anti-Gm-Seren wie Humanseren des Phänotyps Gm(-1,2): Sie inhibierten bei der Gm(2)-Bestimmung vollständig, im Gm(1)-Test dagegen nicht mehr.

Der Agglutinationstiter des Rinderserums Rs 92 gegen "Gm(2)-Erythrozyten" betrug 1:400; gegenüber "Gm(1)-Erythrozyten" lag der Titer bei 1:100, in Abhängigkeit von dem zur Sensibilisierung verwandten Anti-D-Gm(1)-Serum (nicht von der "Güte" der Sensibilisierung).
Die Antikörperreaktionen von Rs 92 waren nach Lagerung des konzentrierten, absorbierten Rinderserums über 4 Monate bei +4°C oder 10 Monate bei -20°C unverändert.
Das Reaktionsoptimum des Rs 92 mit sensibilisierten Erythrozyten ergaben Inkubationstemperaturen zwischen +4°C und +12°C, während bei +37°C nahezu keine Agglutination sichtbar war.
Nach Behandlung des Rinderserums Rs 92 mit Mercaptoethanol oder mit Papain konnte eine Agglutinatinsfähigkeit mit "Gm(1)-" oder "Gm(2)-Erythrozyten" nicht mehr nachgewiesen werden.
Bei der radialen Immundiffusion und bei Immunelektrophoresen kam es nicht zur Darstellung von präzipitierenden Antikörpern des Rinderserums Rs 92 gegenüber Substanzen im menschlichen Serum.

Versuche mit Protein A von Staphylococcus aureus:

Die Wirkung von Protein A auf die Agglutinationsfähigkeit der Rinderseren konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht geprüft werden, da die Inkubation mit Protein-A-Lösung stets zur Agglutination der verwendeten Erythrozyten führte (Agglutinationsstärke 1-2). Diese Reaktion war unabhängig von der Blutgruppe bzw. der Behandlung sensibilisierter oder nicht sensibilisierter Zellen und trat mit beiden getesteten Proteinprodukten (Calbiochem; Serva) auf. Wiederholte Durchführung der Methode, auch mit veränderten Reaktionsbedingungen (Zeit, Temperatur, Konzentrationsverhältnisse) erbrachte stets das gleiche Ergebnis. Auch nach dem Waschen der Erythrozyten stellte sich die Agglutination unverändert dar. Weitere Beobachtungen, z.B. die Steigerung der Agglutination der Protein-A-behandelten Erythrozyten bis Stärke 4 durch Zugabe von konzentrierten oder verdünnten Humanseren (1:80 verdünnt), von Human-IG-Lösung, von Hammel-, Kaninchen-, Rinderseren (jeweils frei von spezifischen Antikörpern gegen die getesteten Erythrozyten) bzw. keine Zunahme der Agglutinationsintensität durch Zugabe von Rinderalbumin-Lösung, haben für die Untersuchungen der Rinderseren keine Relevanz.

4. Diskussion

4.1 Bemerkungen zur Versuchsanordnung

Von 203 Rinderseren zeigten 45 Serumproben deutliche Antihumanglobulin-Eigenschaften und wurden als Anti-Gm-Seren im Agglutinationshemmtest mit verschiedenen Humanseren getestet. Hier fielen 2 Rinderseren (Rs 55, Rs 92) durch besonders differenzierte Reaktionen auf und wurden in weiteren Tests gezielt untersucht.
Die Antihumanglobulin-Eigenschaften der anderen 43 Rinderseren konnten nicht in Zusammenhang mit bekannten Gm-Spezifitäten gebracht werden. Dennoch befinden sich möglicherweise Anti-Gm-Seren unter ihnen, da das Suchpanel mit 40 Humanseren einen begrenzten Umfang hatte, und Gm-Faktoren mit sehr hoher oder sehr niedriger Frequenz könnten unerkannt geblieben sein.
Für die Fragestellung dieser Arbeit wird diese Problematik zunächst zurückgestellt, denn das Ziel der Untersuchung war die Überprüfung einer möglichen Verwendung von Rinderseren als Anti-Gm-Seren zu Gm-Bestimmungen.

Im Rheumafaktor-Latex-Test konnten in Rinderseren keine Antihumanglobulin-Eigenschaften nachgewiesen werden. Die Latexpartikel des Testreagenzes sind mit "gepoolten Human-Immunglobulinen" (Herstellerangabe Behring) beladen, die z.B. mit Coombsseren reagieren. Eine Austestung ergab jedoch keine Agglutination des Latexreagenzes durch Anti-Gm(1)- oder Anti-Gm(2)-Seren.
Das negative Ergebnis mit Rinderseren könnte deshalb durch die Struktur der adsorbierten Immunglobuline begründet sein.

4.2 Spezifität des Rinderserums Rs 55

Für die Gesamtbeurteilung des Rinderserums Rs 55 müssen alle festgestellten Reaktionseigenschaften berücksichtigt werden:

Rs 55 reagierte bei Anwendung als Anti-Gm-Serum im Agglutinationshemmtest mit über 500 Humanseren verschiedener Gm-Phänotypen ausnahmslos wie ein Anti-Gm (1)-Serum, das bedeutet, alle menschlichen Seren mit dem Allotyp Gm(1) führten zur Hemmung der Agglutination sensibilisierter Erythrozyten durch Rs 55; die Hemmung war unabhängig vom übrigen Gm- bzw. Km-Phänotyp. Humanseren mit ungewöhnlichen Phänotypen: Gm(-17,-1,2) oder Gm(-17,1,-2) ergaben ebenfalls keine Abweichungen.
Humanseren, die ursprünglich den Allotyp Gm(1) besaßen, hemmten nach Absättigung des Faktors Gm(1) durch Behandlung mit Anti-Gm(1)-Serum die Agglutinationsfähigkeit des Rinderserums nicht mehr. Wurden entsprechende Humanseren umgekehrt mit Rinderserum Rs 55 abgesättigt, reagierten sie bei der üblichen Gm(1)-Bestimmung wie Humanseren mit Gm(-1), Rs 55 hatte offenbar den Faktor Gm(1) neutralisiert. - Diese Versuche mit absorbierten Humanseren unterstützen die Bewertung des Rinderserums Rs 55 als Anti-Gm(1)-Serum. Die Einstufung ihrer Aussagekraft für die Sicherung seiner Spezifität erfolgt unter folgenden Voraussetzungen:
- Bei Anlagerung eines Antikörpers an einen bestimmten Rezeptor eines Proteinmoleküls werden auch die Nachbarregionen beeinflußt, z.B. kann es zur sterischen Behinderung einer Anlagerung weiterer Antikörper kommen, so daß die benachbarten Rezeptoren als Antigen nicht mehr verfügbar wären. Die schweren Ketten (H-chains) eines IgG_1-Moleküls können gleichzeitig die beiden Marker Gm(1) und Gm(2) aufweisen. In den durchgeführten Versuchen konnten beide Faktoren "parallel" untersucht werden, d.h., Anti-Gm(1)-Antikörper, die bereits mit

einem Humanserum des Phänotyps Gm(1,2) reagiert hatten, behinderten die anschließende Erkennung des Faktors Gm(2) in diesem Serum nicht. Ebenso störten Anti-Gm(2)-Antikörper nicht die Bestimmung des Faktors Gm(1). Entsprechend konnte bei diesen Humanseren nach Absättigung mit Rs 55 der Faktor Gm(2) noch nachgewiesen werden, während der Faktor Gm(1) nicht mehr nachweisbar war.

- Die Größe der Bindungsstelle, die für Antiprotein-Antikörper der Klasse IgG_1 mit 4 - 6, der Klasse IgM mit 3 - 4 Aminosäuren angegeben wird (23), ist nicht immer identisch mit der Antigenbindungsstelle. Der Faktor Gm(1) ist charakterisiert durch die Aminosäuresequenz 356 -360 Asparagin - Gluaminsäure - Leucin - Threonin - Lysin (7,46), der Faktor Gm(2) ist ausgeprägt bei Vorhandensein der Aminosäure Lysin in Position 431 (25), beide Faktoren liegen auf dem Fc-Teil der H-Ketten von IgG_1-Molekülen. Das Ergebnis der Absättigung von Humanseren mit Rs 55 spricht für eine Übereinstimmung des nachgewiesenen Antigens mit dem Faktor Gm(1), da nur der Faktor Gm(1), nicht aber der benachbarte Faktor Gm(2) abgesättigt wurde. Entsprechende Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen sensibilisierter Erythrozyten im Anschluß an eine Inkubation mit papainisiertem Rs 55: Die vorinkubierten "Gm(1)-" bzw. "Gm(2)-Erythrozyten" wurden von Anti-Gm(1)-Seren nicht mehr agglutiniert, Anti-Gm(2)-Seren führten hingegen unverändert zur Agglutination der "Gm(2)-Erythrozyten". Wenn man davon ausgeht, daß durch die Papainbehandlung die agglutinierende Wirkung von Antikörpern verloren geht, Antigen-Bindung aber möglich bleibt, wäre eine blockierende Wirkung der veränderten Antikörper zu erwarten, die das vorliegende Ergebnis erklärt. Die blockierenden Antikörper des Papain-behandelten Rinderserums könnten die Gm(1)-Anteile der Im-

munglobuline auf den sensibilisierten Erythrozyten besetzt haben und eine Reaktion des agglutinierenden Anti-Gm(1)-Serums verhindern, während die Gm(2)-Strukturen unbesetzt und als Antigen nachweisbar blieben.
Die Auswertung der Untersuchungen zeigt, daß serologisch alle Reaktionsergebnisse die Spezifität Anti-Gm(1) des Rinderserums Rs 55 belegen.

Der Agglutinationstiter des Rinderserums Rs 55 gegen "Gm(1)-" und "Gm(2)-Erythrozyten" lag mit 1:100 hoch im Vergleich zu menschlichen Anti-Gm-Seren; SNagg-Seren haben im günstigsten Fall Titer von 1:32 bis 1:64 (3,33). Eine Verdünnung des Rinderserums von 1:10 bis 1:20 erwies sich im Agglutinationshemmtest als vorteilhaft. Eine unspezifische Hemmung durch konzentrierte Humanseren mit Gm(-1), wie sie bei Ragg-Seren vorkommt, wurde bei Rs 55 nicht beobachtet.
Die Lagerung des konzentrierten absorbierten Rinderserums konnte mehrere Monate bei +4°C im Kühlschrank erfolgen, ohne daß es zu einem Abfall der Reaktionsfähigkeit kam. Eine Aufbewahrung verdünnten Rinderserums bei dieser Temperatur führte schon nach kurzer Zeit zum Titerabfall; eine Verdünnung erfolgte deshalb erst kurz vor Gebrauch.

Abschließende Beurteilung des Rinderserums Rs 55:

Der hohe Titer, die gute Stabilität und vor allem die dargestellte Spezifität sind günstige Eigenschaften, welche die Anwendung von Rinderserum Rs 55 als Anti-Gm(1)-Serum zur routinemäßigen Gm(1)-Bestimmung gerechtfertigt erscheinen lassen.

4.3 Eigenschaften des Rinderserums Rs 92

Die Ergebnisse der Versuche mit Rinderserum Rs 92 sind mit bekannten Gm-Merkmalen nicht übereinstimmend zu erklären, obwohl spezifische Reaktionen, die im Zusammenhang mit den Allotypen Gm(1) und Gm(2) stehen, deutlich werden.
Die Ergebnisse bei der Verwendung von Erythrozyten, sensibilisiert mit Antikörpern des Phänotyps Gm(1,-2) oder mit Gm(1,2), werden zunächst getrennt ausgewertet.

"Gm(1)-Erythrozyten"
Abhängig von dem zur Sensibilisierung eingesetzten Anti-D-Gm(1,-2)-Serum war die Agglutinationsstärke bzw. die auftretende Hemmung durch Humanseren des Phänotyps Gm(1,-2) unterschiedlich ausgeprägt: Während bei bestimmten Anti-D-Gm-Seren nahezu alle Humanseren des Typs Gm(1,-2) komplett inhibierten, führten dieselben Humanseren bei Sensibilisierung mit Anti-D-Gm(1,-2)-Seren anderer Spender nur zur Abschwächung der Agglutination. Quantitative Veränderungen, z.B. Anwendung abgestufter Humanserum-Konzentrationen oder schwächere Sensibilisierung der Erythrozyten beeinflußten den Reaktionsausfall nicht; Abschwächung oder Hemmung traten bei den einzelnen Humanseren reproduzierbar auf.
Ebenso wie Rh-Antikörper des Phänotyps Gm(1,-2) zeigten Humanseren des Typs Gm(1,-2) uneinheitliche Reaktionen: Auch bei Übereinstimmung in allen bestimmbaren Markern auf Immunglobulinen zeigten einige Seren des Typs Gm(1,-2) komplette, andere nur partielle Inhibition.
Möglicherweise waren geringe Abweichungen der IgG_1-Molekülstruktur der Humanseren entscheidend für ihre unterschiedlichen Reaktionen mit Rs 92: Es könnten heterogene Strukturen zwischen den Aminosäuren 356 - 360

und 431 der H_1-Ketten, also den Positionen für Gm(1) und Gm(2) vorliegen. Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) wiesen die zur Hemmung der Agglutination von "Gm(1)-Erythrozyten" notwendige Struktur stets auf, Seren des Typs Gm(1,-2) zeigten Differenzen. Diese Differenzen könnten sich auf die Raumstruktur der Polypeptide beschränken, da sich Proteine mit gleicher Primärstruktur infolge unterschiedlicher Tertiär- und Quartärstruktur serologisch unterscheiden können (42). Die immunologischen Determinanten sind dann nicht durch die Aminosäuresequenz zu erfassen, sondern als Folge einer bestimmten Molekülkonfiguration zu betrachten. Die Abhängigkeit der serologischen Erkennung einer Gm-Spezifität auch von der Tertiär- und Quartärstruktur sowie von der Interaktion mit benachbarten Peptidstrukturen ist bekannt (3). Auf die Bedeutung der Tertiärstruktur des Fc-Fragments für die Erkennung des Faktors Gm(1) wiesen Turner et al 1969 hin (47). Bargagna et Domenici (3) deuteten ebenfalls den komplexen Zusammenhang zwischen Gm-Faktoren und Struktur der Immunglobuline an: "Wenn jeder Allotyp einen speziellen Aminosäureaustausch erforderte, sollte man mehrere Sequenzunterschiede zwischen G3m(5)- und G3m(21)-γ_3-Ketten finden als bis jetzt bekannt sind." Außerdem verwiesen sie auf folgende Reaktionseigenschaft von Anti-nGlm(1)-Seren: Die meisten Anti-nGlm(1)-Seren reagieren nicht mit dem Isoallotyp nGm(1) auf IgG_4-Molekülen, da γ_4-Ketten in Position 355 die Aminosäure Glutamin besitzen, γ_1-, γ_2- und γ_3-Ketten hingegen Asparagin.

"Gm(2)-Erythrozyten"

Die Agglutination von "Gm(2)-Erythrozyten" durch Rinderserum Rs 92 wurde ausschließlich von Humanseren des Typs Gm(1,2) inhibiert, alle anderen Seren bewirkten keine Inhibition. Die Hemmung durch Seren mit Gm(1,2)

war ungestört, auch wenn das Rinderserum zuvor mit Seren des Phänotyps Gm(1,-2) inkubiert wurde. Ein Gemisch aus Humanseren des Phänotyps Gm(1,-2) und Gm(-1,2), das eine Zusammensetzung der Faktoren Gm(1) und Gm(2) (sowie Gm(17)) darstellte, konnte die Agglutination der "Gm(2)-Erythrozyten" nicht hemmen. Im Gegensatz zu Humanseren des Phänotyps Gm(17,1,2), die stets Inhibition bewirkten, lagen die Faktoren Gm(17), Gm(1) und Gm(2) in dem Gemisch nicht zusammen auf einem Molekül vor.

Welcher Rückschluß auf die Antikörper-Spezifität des Rinderserums Rs 92 ist möglich? - Den Reaktionen im Agglutinationshemmtest mit "Gm(2)-Erythrozyten" könnte eine Antikörper-Spezifität zugrunde liegen, welche mit IgG_1-Molekülen des Phänotyps Gm(1,2) reagiert. Die Untersuchungsergebnisse mit "Gm(1)-Erythrozyten" sprechen jedoch für das Vorliegen von zwei getrennten Antikörper-Spezifitäten in diesem Rinderserum: Rs 92 reagierte mit IgG_1-Molekülen des Phänotyps Gm(1,-2), z.B. auf sensibilisierten Erythrozyten, ohne daß seine Antikörper-Aktivität dabei vollständig abgesättigt wurde. Die Reaktionsfähigkeit mit IgG_1-Molekülen des Phänotyps Gm(1,2) war erhalten, und konnte nur durch Seren des Typs Gm(1,2) inhibiert werden (s. Abschnitt 2.4.3c, Anwendung von Humanseren mit Gm(1,-2) und Gm(1,2) hintereinander im Agglutinationshemmtest). Soweit überprüfbar, unterschieden sich diese Seren von denen mit Gm(1,-2) nur durch das Vorhandensein des Faktors Gm(2). Durch Seren des ungewöhnlichen Phänotyps Gm(-1,2), welche doch ebenfalls den Faktor Gm(2) aufweisen, konnte hingegen auch nach Vorinkubation von Rs 92 mit Seren des Typs Gm(1,-2) keine Hemmung erzielt werden. Die Feststellung dieses Ergebnisses gab Veranlassung zu der Frage, ob der Faktor Gm(2) bei Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) eventuell nicht identisch ist mit dem

Merkmal der Seren, die als Gm(-1,2) bezeichnet werden. Die beobachteten Untersuchungsergebnisse könnten folgende Ursachen haben:

- 1. Wechselwirkung der Faktoren Gm(1) (u. evt. Gm(17)) mit Gm(2), so daß der Faktor Gm(2) durch den Faktor Gm(1) in seiner serologischen Nachweisbarkeit beeinflußt wird. Die Bedeutung der An- und Abwesenheit von Faktoren für die serologische Erkennung anderer Faktoren wurde 1977 von van Loghem (22) diskutiert. Durch die Interaktion eines Abschnittes des Globulinmoleküls mit einem anderen Teil des Moleküls könnte es zu einer sterischen Veränderung und Entstehung der immunologischen Rezeptoreigenschaft kommen.

- 2. Vorliegen von Faktoren, die genetisch eng gekoppelt sind mit den Faktoren Gm(1) und Gm(2). Bei der Entstehung des Phänotyps Gm(-1,2) durch intracistronisches Crossingover wäre von Bedeutung, an welcher Stelle zwischen den Genen für die Faktoren Gm(1) und Gm(2) sich das Chiasma bildet. Ebenso wie bei der Entstehung durch Punktmutation ist zu erwarten, daß gewöhnlich mit Gm(1) und Gm(2) auftretende Faktoren fehlen, z.B. Gm (17), so daß Gm(-17,-1,2) vorliegt, was sich bei allen getesteten Humanseren mit Gm(-1,2) bestätigte. Bei der Austestung mit Rinderserum Rs 92 "f e h l t e" den Humanseren des Phänotyps Gm(-1,2) die Fähigkeit zur Inhibition der Antikörper-Aktivität des Rinderserums (auch in Kombination mit Seren des Phänotyps Gm(1,-2)), die bei Seren des Typs Gm(1,2) stets vorhanden war.

- 3. Faktoren, die im IgG_1-Molekül sehr nahe oder zwischen den Faktoren Gm(1) und Gm(2) liegen und deshalb von Antiseren im allgemeinen nicht differenziert werden (diese Vorstellung von heterogenen Strukturen wurde bereits erörtert, s.o.).

Die Beurteilung der Reaktionseigenschaften des Rinderserums Rs 92 kann folgendermaßen zusammengefaßt werden: Wenn die Definition eines Anti-Gm(2)-Serums Hemmbarkeit durch Humanseren der Phänotypen Gm(1,2) und Gm(-1,2) verlangte, könnte Rinderserum Rs 92 nicht als Anti-Gm (2)-Serum verwendet werden.

Ergänzung zur Beurteilung des Rinderserums Rs 92:

In demselben Zeitraum, als die Untersuchungen mit Rinderseren durchgeführt wurden, konnte im Zusammenhang von Gm-Bestimmungen für Paternitätsgutachten (29) ein menschliches (kommerzielles) "Anti-Gm(2)-Serum" ermittelt werden, welches nur durch Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) gehemmt wurde, nicht aber durch Seren mit Gm(-1,2). Keine Hemmung bewirkten erwartungsgemäß Humanseren der Phänotypen Gm(-17,-1,-2), Gm(17,1,-2) und Gm(-17,1,-2). Testerythrozyten, sensibilisiert mit Anti-D-Gm(1,-2), wurden von diesem "Anti-Gm(2)-Serum" nicht agglutiniert; durch Absorption des Antiserums mit Humanseren des Phänotyps Gm(1,-2) war es nicht möglich, ein auch durch Seren mit dem Phänotyp Gm(-1,2) hemmbares Anti-Gm(2)-Serum herzustellen. Begleitspezifitäten wurden in diesem "Anti-Gm(2)-Serum" nicht gefunden. Gemische z.B. aus Humanseren mit Gm(1,-2) und Gm(-1,2) bewirkten keine Inhibition. Offensichtlich reagierten nur IgG_1-Moleküle mit diesem "Anti-Gm(2)-Serum", die gleichzeitig die Faktoren Gm(1) und Gm(2) aufwiesen.

Dieses "Anti-Gm(2)-Serum" reagierte also ähnlich wie Rinderserum Rs 92: Humanseren mit dem ungewöhnlichen Phänotyp Gm(-1,2)-Serum" blieben unerkannt.

Eine Bezeichnung des Antiserums könnte zutreffender "Anti-Gm(1,2)-Serum" lauten. Die Spezifität Anti-Gm(1,2) im Gm-System wäre eine Analogie zu den kombinierten Antikörpern des Rh-Systems, welche ausschließ-

lich mit zusammengesetzten und Hybrid-Antigenen reagieren, wie z.B. Anti-f(ce). Anti-f reagiert nur dann, wenn sich die für das c-Antigen und e-Antigen zuständigen Gene in cis-Position, d.h., auf einem Chromosom befinden. Durch Absorption läßt sich der Antikörper Anti-f nicht in Anti-c und Anti-e trennen.

4.4 Genese der Antihumanglobulin-Eigenschaften in Rinderseren

Die Reaktionseigenschaften der beschriebenen Rinderseren weisen Charakteristika auf, die häufig auf sogenannte natürliche Antikörper bzw. IgM-Antikörper zutreffen, z.B. Reaktionsoptimum im unteren Temperaturbereich, Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen wie Mercaptoethanol.
Die Beantwortung der Frage nach der Genese von Antihumanglobulin-Antikörpern in Rinderseren wäre von wissenschaftlichem und praktischem Interesse.

Eine Immunisierungsgenese durch menschliches Eiweiß im Rahmen von Medikation oder Fütterung der Tiere wäre denkbar und könnte durch Untersuchung verabreichter Substanzen nachgewiesen werden. Die Überprüfung eines bei Rindern angewandten menschlichen HCG (Human Chorion Gonadotropin)-Präparates (Ekluton, Vemie Veterinär Chemie, Kempen) ergab keinen Hinweis auf eine Zufuhr von Immunglobulinen in dieser Form.

Gm-Faktoren bei Rindern wurden mehrfach untersucht, insbesondere die Merkmale Gm(1), Gm(2), Gm(5) und Gm(6) von Podliachouk 1959/62 (30,31), aber es wurde keiner der genannten Faktoren in Rinderseren gefunden.

Eine diaplazentare Übertragung von IgG-Molekülen ist bei Rindern nicht erkennbar (49); das neugeborene Kalb wird über die Kolostralmilch mit Antikörpern versorgt, so daß eine Sensibilisierung der Tiere wie sie beim Menschen auf diaplazentarem Wege vorkommt (Steinberg-Speiser- Phänomen), nicht zu erwarten ist.

Eine humorale Immunantwort auf "verwandte" Antigene dürfte zur Zeit als Entstehungsursache dieser Antihumanglobulin-Eigenschaften favorisiert werden. Eine Antigengemeinschaft z.B. der Gm(1)-Substanz mit Antigenen von Bakterien, Viren oder anderen Agenzien, die Mensch und Tier befallen und eine Antigen-Antikörperreaktion auslösen, könnte die Bildung von Gm-Antikörpern bei Rindern hervorrufen. Die Verbreitung der Gm(1)-Struktur bzw. kreuzreagierender Antigene wäre zu prüfen z.B. durch Untersuchung von Bakterien auf Gm-Substanz bzw. auf Rezeptoren, die mit Anti-Gm-Seren reagieren.

Entsprechende Untersuchungen zu dieser Frage wurden in Anknüpfung an die vorliegende Arbeit von Henke et al. (15) durchgeführt und bestätigten die hypothetischen Überlegungen. Verschiedene getestete Escherichia coli Stämme bewirkten im Agglutinationshemmtest deutliche Inhibition von Anti-Gm-Seren, insbesondere der Spezifitäten Anti-Glm(2) und Anti-G3m(10).

Andere Wechselwirkungen von Bakterienepitopen und menschlichen Immunglobulinen, unabhängig von bestimmten Allotypen, waren bereits bekannt, z.B. das von Staphylococcus aureus-Stämmen produzierte Zellwandprotein "Protein A", das u.a. mit dem Fc-Fragment von IgG_1-, IgG_2- und IgG_4-Molekülen reagiert (6,20,43,44). Streptokokkenstämme der Gruppen A, C und G produzieren und besitzen ebenfalls Fc-Fragment-bindende Oberflächenkomponenten mit hoher IgG-Anlagerungskapazität (24). Der Nachweis von bakteriellen Antigenstrukturen,

die Kreuzreaktionen mit menschlichen Immunglobulin-Allotypen aufweisen, könnte das Vorkommen von Gm-Antikörpern bei gesunden, nicht spezifisch immunisierten Personen erklären. Als Ursache kommen inapparente Infektionen bzw. Kontakt und Immunisierung gegen ubiquitäre Keime mit den entsprechenden antigenen Strukturen in Frage. Eine infektiöse Auslösung der rheumatoiden Polyarthritis, die häufig mit der Bildung von Anti-Gm-Antikörpern einhergeht, wird diskutiert (19) und würde zu diesen Überlegungen passen.

Grubb wies darauf hin, daß die rheumatoide Arthritis in den Tropen und bei Eskimos sehr selten vorkommt (11), und in beiden Populationen der Faktor Gm(1) in nahezu 100 % nachweisbar ist. Andererseits zeigen Gm-Bestimmungen bei Rheumatikern keine Abweichung zur Frequenz der Faktoren in der Normalbevölkerung; Überblick bei Grubb (12).

Auffallend ist sicher die Tatsache, daß bei Ragg- und SNagg-Seren die Spezifität Anti-Gm(1) am häufigsten angetroffen wird, und daß das erste jetzt entdeckte Rinderserum (Rs 55) mit Anti-Gm-Spezifität ebenfalls die Spezifität Anti-Gm(1) aufweist.

4.5 Serogenetische Anwendung von Rinderseren als Anti-Gm-Testseren

Die Erkennung eines spezifischen Anti-Gm-Serums unter 203 getesteten Rinderseren entspricht einer Häufigkeit von ca. 0,5 % und erscheint damit kaum günstiger als die Frequenz, mit der in menschlichen Normalseren Anti-Gm-Eigenschaften gefunden werden; dabei bleibt der hohe Titer des Rinderserums Rs 55 von 1:100 gegen "Gm(1)-Erythrozyten" unberücksichtigt, dem ein durchschnittlicher Titer in menschlichen Anti-Gm(1)-Seren von 1:16 bis 1:32 gegenübersteht.

Bei routinemäßiger Durchführung könnte man den technischen Ablauf so wählen, daß zunächst von lebenden Tieren eine Serumprobe entnommen und untersucht würde; beim Vorliegen von Anti-Gm-Eigenschaften könnten dann gezielt von diesem Rind große Serummengen gewonnen werden oder bei Stabilität des Titers wiederholt Material entnommen werden.

Die Gewinnung großer Antiserumquantitäten vom Rind würde die Bestimmung eines Gm-Merkmals mit dem gleichen Testreagenz über lange Zeit und zu geringen Kosten sicherstellen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Agglutinationshemmtest bei 45 Rinderseren mit Antihumanglobulin-Aktivität zeigen, daß die Antihumanglobulin-Eigenschaften der verschiedenen Rinderseren keineswegs identisch sind, z.B. reagierte die Mehrzahl der Rinderseren bevorzugt mit Erythrozyten, die mit inkompletten Antikörpern der Subklasse IgG_1 beladen waren. Es darf erwartet werden, daß in Zukunft weitere Rinderseren mit Anti-Gm-Spezifitäten gefunden werden.

Eine Gewinnung von Anti-Gm-Seren von Rindern gegen Merkmale, die zur Zeit wegen Serummangel nicht bestimmt werden können oder noch unbekannt sind, ist anzustreben.

5. Zusammenfassung

1. Bei der Untersuchung von 203 Rinderseren im Agglutinationstest mit Erythrozyten, die mit inkompletten menschlichen Antikörpern beladen waren, konnten in 45 Rinderseren (ca. 22 %) deutliche Antihumanglobulin-Eigenschaften nachgewiesen werden.

2. Diese 45 Rinderseren wurden als Anti-Gm/Km-Seren im Agglutinationshemmtest mit 40 Humanseren geprüft, um durch Beobachtung der Hemmwirkung Hinweise auf eine mögliche Spezifität der Antihumanglobulin-Eigenschaften zu erhalten.

3. Im Agglutinationshemmtest zeigten 2 Rinderseren (Rs 55, Rs 92) besonders differenzierte Reaktionen. Sie wurden als Anti-Gm-Seren im Agglutinationshemmtest bei Reihenuntersuchungen mit zahlreichen Humanseren getestet, auch bei Seren mit ungewöhnlichen Gm-Phänotypen, bei Serum-Gemischen sowie bei neutralisierten (mit Anti-Gm-Serum) Humanseren. Gm-Typisierungen bei Humanseren, abgesättigt mit Rinderserum, wurden durchgeführt. Reaktionseigenschaften der beiden Rinderseren (Titer; Stabilität; Spezifität; Reaktionstemperatur; Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen oder Enzymbehandlung) wurden dargestellt, Versuche mit Protein A und Untersuchungen zum Nachweis präzipitierender Antikörper schlossen sich an.

4. Rs 55 wurde als spezifisches Anti-Gm(1)-Serum, Titer 1:100, identifiziert. - Eine Beziehung des Rs 92 zu Gm-Spezifitäten war zu erkennen. Seine Anwendbarkeit als Anti-Gm(2)-Serum wurde getestet; Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) bewirkten stets Reaktionshemmung, Seren des seltenen Typs Gm(-1,2) hemmten nicht.

5. Die wissenschaftliche und praktische Bedeutung der gefundenen Anti-Gm-Eigenschaften in Rinderseren sowie die mögliche Genese dieser offenbar "natürlichen" Antikörper wurden diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

(1) Audran, R. (1965): Etude de l'activité anti-Gm des sérums normaux. Path. et Biol. 13, 5, 1-2.

(2) Armangué, M. (1945): L'hétérophilie en général. Schweiz. Z. Path. Bakt. 8, 361

(3) Bargagna, M., Domenici, R. (1980): Genetic markers of human immunoglobulins in forsensic medicine. Frankfurt/Main (Biotest)

(4) Boyden, S.V. (1966): Natural antibodies and the immune response. Adv. Immunol. 5, 1

(5) Brandtzaeg, B., Mohr, J. (1961): The Gm(r) serum group. Acta genet. Statist. Med. 11, 170-177

(6) Forsgren, A. (1968): Protein A from staphylococcus aureus. Acta Universitas Upsalienis 56

(7) Frangione, B., Fanklin, E.C., Fudenberg, H.H., Koshland, M.E. (1966): Structural studies of Human γG-mieloma proteins of different antigenetic subgroups and genetic specifities. J. Exp. Med. 124, 715

(8) Fünfhausen, G. (1961): Die Gm^a Frequenz in Berlin mit Angaben über die Häufigkeit geeigneter Anti Rh-Seren und sog. Präcipitierender Seren. Blut VII, 331

(9) Göhler, W. (1966): Genetische Untersuchungen zum Gm-System. Habilitationsschrift Leibzig.

(10) Grubb, R. (1956): Agglutination of erythrocytes with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups. Acta path. mirobiol. scand. 39, 195

(11) Grubb, R. (1959): Hereditary gamma globulin groups in man. Ciba Foundation Symposium on Biochemistry of Human Genetics, 264 Churchill, London 1959

(12) Grubb, R. (1970): The Genetic Markers of Human Immunoglobulins. Berlin (Springer), S. 8

(13) Grubb, R., Laurell, A.B. (1956): Hereditary serological human serum groups. Acta path. microbiol. scand. 39, 390

(14) Harboe, M., Fölling, I. (1974): Recognition of two distinct groups of human IgM and IgA based on different bindung to staphylococci. Scand. J. Immunol. 3, 471-482

(15) Henke, J., Boes, C., Driesel, A.J., Schweitzer, H., Sagan, Z. (1985): Zur Frage einer möglichen Partialantigengemeinschaft zwischen der menschlichen Ig-Allotyp-Struktur und ubiquitären Keimen, untersucht am Beispiel von Escherichia coli. Zeitschrift für Rechtsmedizin 95 (2), 97-103

(16) Issit, P., Issit, Ch. (1976): Applied Blood Group Serologie, Spectra Biologicals, Division of Becton, Dickinson and Company, Oxnard, California, S. 32

(17) Joysey, V.C. (1959): The relation between animal and human bloodgroup. Brit. med bullet 15, 158

(18) Kirst, R. (1982): Ein neuer menschlicher Gm-Reaktionstyp, dargestellt mit einem Rinderserum. Acta biol. med. germ. 41, 4, K 17 - K 18

(19) Kühn, H.A., Schirmeister, J. (1982): Innere Medizin begr. von Heilmeyer, L., Berlin (Springer), S. 314

(20) Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjöquist, J. (1983): Binding of Immunoglobulins to Protein A and Immunoglobulin Levels in Mammalian Sera. Journal of Immunological Methods 62, 1-13

(21) Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L., Harper, H.A. (1979): Physiologische Chemie. Berlin (Springer)

(22) Loghem, van E., Blanc, M., Lange, de G. (1977): Human IgG_3 allotypes with special references to a new allotype related to G3m(g) (G3m21). J. Immunogenetics 4, 371

(23) Murphy, P.D., Sage, H.J. (1970): Variation in the size of antibody sites for the poly-l-aspartate hapten during the immune response. J. immunol. 105, 460

(24) Myhre, E.B., Kronvall, G. (1977): Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among grampositive cocci: description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. Infect. Immun. 17, 475-482

(25) Nabeshima, Y., Ikemida, T., Arima, T. (1976): N- and C-terminal aminoacid sequences of gamma heavy chain disease proteine Yok. Immunochem. 13, 245

(26) Nagai, T., Ishiyama, I., Prokop, O., Köhler, W. (1982): Hemmung der Reaktion von Coombs-Seren mit IgG-sensibilisierten humanen Erythrozyten durch Protein A. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 252, 425-429

(27) Nagai, T., Ishiyma, I., Köhler, W., Prokop, O., Rackwitz, A. (1982): Hemmung der Gm-Reaktion durch Protein A. Ärztl. Lab. 28, 357-358

(28) Nisonoff, A., Wissler, F.C., Woernley, D.L. (1960): Properties of univalent fragments of rabbit antibody isolated by specific adsorption. Arch. Biochem. Biophys. 88, 241-249

(29) Osterhaus, E. (1983): Mündliche Mitteilung, Februar 1983

(30) Podliachouk, L. (1959): Le facteur sérique Gm^a dans le sérum d'animaux de différentes espèces. Ann. Inst. Pasteur 96, 362-364

(31) Podliachouk, L. (1962): Les facteurs sériques Gm(a), Gm(b), Gm(x) et Gm-like dans le sérum d'animaux de différentes espèces. Ann. Inst. Pasteur 102, 759-762

(32) Porter, R.R. (1959): The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 73, 119-127

(33) Prokop, O. (1983): Mündliche Mitteilung, August 1983

(34) Prokop, O., Göhler, W. (1976): Die menschlichen Blutgruppen. Stuttgart (G. Fischer)

(35) Prokop, O., Uhlenbruck, G. (1966): Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. Leibzig (VEB Thieme)

(36) Ritter, H., Schmittmann, E. (1964): Das Anti-Inv-1-Rie. Humangenetik 1, 144

(37) Ropartz, C., Lenoir, J. (1960): Les antiglobulines humaines présentées dans les sérums de sujets normaux. Fréquence et caractéristiques sérologiques. Rev. hémat. 15, 40

(38) Ropartz, C., Rousseau, P.Y., Rivat, L., Fuddenberg, H.H. (1966): Seven new human serum factors presumably supported by the gamma-globulins. Vox. Sang. 11, 99

(39) Ropartz, C., Roussau, P.Y, Rivat, L., Rivat, C. (1967): Un nouveau facteur du système Gm:le Gm(18). Rev. franc. Etud. clin. biol. 12, 443-451

(40) Sagan, Z. (1981): Auftreten natürlicher Antikörper gegen menschliche Gammaglobuline in Rinderseren. Vortrag, Symposium Gerichtliche Medizin mit internationaler Beteiligung, Berlin, 28. -30. Sep. 1981

(41) Scheder, F. (1976): Zoologisch-systematische Untersuchungen über das Vorkommen und Verteilung präformierter natürlicher Antikörper in Säugetieren. Dissertation München 1976

(42) Sela, M., Schlechter, B., Schlechter, I., Borek, F. (1967): Antibodies to sequential and conformational determinants. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 32, 537-546

(43) Sjöholm, I. (1975): The interaction between protein A and immunoglobulin G as studied with the F_c-fragment of a myeloma protein by circular dichroism. FEBS Lett. 52, 53-56

(44) Sjöqvist, J., Forsgren, A., Gustafson, G.T., Stalenheim, G. (1967): Interaction between gammaglobulins and protein A from Staphylococcus aureus. In: Nobel Symp. 3, S. 341-348 Gammaglobulins. Killander, J. Ed. Stockholm: Almqvist & Wiksell

(45) Thomas, L. (1984): Labor und Diagnose. Die Medizinische Verlagsgesellschaft (Marburg/Lahn), S. 620-622

(46) Thorpe, N.O., Deutsch, H.G. (1966): Studies on papainproduced subunits of human G-globulins. II. Structures of peptids related to the genetic Gm activity of G-globulin Fc fragments. Immunochemistry 3, 329

(47) Turner, M.W., Martensson, L., Natvig, J.B., Bennich, H. (1969): Genetic (Gm) antigens associated with subfragments from the Fc fragment of human immunoglobulin. Nature (Lond.) 221, 1166-1169

(48) WHO (1976): Revies of the notation for the allotypic and related markers of the human immunoglobulins (WHO Meeting on human immunoglobulin allotypic markers, held 16 - 19 July 1974, Rouen, France. Report amended June 1976) J. of Immunogenetics 3, 357

(49) Wurmbach, H. (1970): Lehrbuch der Zoologie. Stuttgart (G. Fischer), S. 465

Lebenslauf

1957	Als Tochter des Ingenieurs Erhard Birkner und dessen Ehefrau Johanna geb. Look am 26. Februar in Hofheim am Taunus geboren
1963	Einschulung in die Schildbergschule in Mülheim an der Ruhr, später Aufnahme in die Kath. Volksschule an der Südallee in Düsseldorf-Benrath
1966	Eintritt in das Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Düsseldorf-Benrath
1969	Besuch des Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in Duisburg-Ruhrort
1975	Abitur
1976	Beginn der Ausbildung zur Medizinisch-Technischen-Laboratoriumsassistentin (MTA) am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin, Duisburg (Dr. Sagebiel)
1978	Staatliche Prüfung und Anerkennung als MTA; Berufstätigkeit im Zentralinstitut an den Städtischen Kliniken Duisburg (Dr. Sagebiel)
1979	Einstellung als MTA in die Abteilung für forensische Serologie des Institutes für Rechtsmedizin der Stadt Duisburg
1980	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf und Fortsetzung der Arbeit in forensischer Serologie am Institut für gerichtliche Medizin in Duisburg (Dr. Osterhaus)
1982	Physikum
1983	1. Staatsexamen Medizin
1985	2. Staatsexamen Medizin
1986	3. Staatsexamen Medizin

Abstract

Bei der Untersuchung von 203 Rinderseren im Agglutinationstest mit Erythrozyten, die mit inkompletten menschlichen Antikörpern beladen waren, konnten in 45 Rinderseren (ca. 22%) deutliche Antihumanglobulin-Eigenschaften nachgewiesen werden.
Diese 45 Rinderseren wurden als Anti-Gm/Km-Seren im Agglutinationshemmtest mit 40 Humanseren geprüft, um durch Beobachtung der Hemmwirkung Hinweise auf eine mögliche Spezifität der Antihumanglobulin-Eigenschaften zu erhalten. Im Agglutinationshemmtest zeigten 2 Rinderseren besonders differenzierte Reaktionen. Diese Rinderseren wurden als Anti-Gm-Seren im Agglutinationshemmtest bei Reihenuntersuchungen mit zahlreichen Humanseren geprüft. Weitere Tests erfolgten bei Humanseren mit ungewöhnlichen Gm-Phänotypen, bei Gemischen aus Seren mit unterschiedlichen Gm-Eigenschaften sowie bei Humanseren nach Neutralisation bestimmter Gm-Faktoren durch Anti-Gm-Seren. Gm-Typisierungen bei Humanseren nach Absättigung mit Rinderserum wurden durchgeführt. Reaktionseigenschaften der beiden Rinderseren (Titer; Stabilität; Spezifität; Reaktionstemperatur; Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen oder Enzymbehandlung) wurden dargestellt. Versuche mit Protein A und Untersuchungen zum Nachweis präzipitierender Antikörper schlossen sich an.
Ein Rinderserum konnte als spezifisches Anti-Gm(1)-Serum, Titer 1:100, identifiziert werden. Eine Beziehung eines zweiten Rinderserums zu Gm-Spezifitäten war zu erkennen. Seine Anwendbarkeit als Anti-Gm(2)-Serum wurde getestet; Humanseren des Phänotyps Gm(1,2) bewirkten stets Reaktionshemmung, Seren des seltenen Typs Gm(-1,2) hemmten nicht. Die wissenschaftliche und praktische Bedeutung der gefundenen Anti-Gm-Eigenschaften in Rinderseren sowie die mögliche Genese dieser offenbar "natürlichen" Antikörper wurden diskutiert.